

Aus dem Institut für
Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie
und Zellbiologie der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. E.M. Klingenberg
Prof. Dr. F. Miller
Prof. Dr. Dr. W. Neupert
Prof. Dr. H.G. Zachau

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER SPERMIENSPEZIFISCHEN
PHOSPHOGLYCERATKINASE DER MAUS**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

vorgelegt von
Albert Wolfgang Obermaier
aus
Stubenberg
München 1984

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W.G.K. Krietsch
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. W. Neupert
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.4.84

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinem Vater

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben; allen voran bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang K. G. Krietsch, dessen Unterstützung sich nicht nur auf den wissenschaftlichen Bereich beschränkt hat.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	3
Methoden	6
Experimente	
Isolierung der PGK	
Rohextrakt	11
Affinitäts-Chromatographie	12
Molekularsieb-Chromatographie	14
Reinheitskontrolle	16
Ionenaustausch-Chromatographie	17
Kontrolle der Trennungsqualität	19
Formenspezifische Aktivitätsverteilung vor und nach der Isolierung	22
Erläuterungen zur Isolierung und Beschreibung der Vorversuche	
Rohextrakt	24
Affinitäts-Chromatographie	24
Molekularsieb-Chromatographie	25
Ionenaustausch-Chromatographie	25
Vergleich physikalischer und chemischer Eigenschaften der drei PGK-Formen	
Molekulargewicht	36
pH-Optimum	36
pH-Stabilität	38
Temperatur-Optimum	40
Aktivierungsenergie	42
Michaelis-Menten-Konstanten	43
Vergleich mit anderen Ergebnissen	46
Allele Isoenzyme in verschiedenen Mäusestämmen	47
Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	48

Diskussion	50
Zusammenfassung	56
Materialien	57
Abkürzungen	59
Literatur	61

Einleitung

Das Enzym Phosphoglyceratkinase (PGK; ATP: 3-phospho-D-glycerat-1-phospho-transferase; EC 2.7.2.3) katalysiert die reversible Reaktion von 1,3-Di-phosphoglycerat nach 3-Phosphoglycerat, wobei der Phosphatrest auf Adenosindiphosphat übertragen wird. Dies ist der erste Schritt der Glykolyse, der ATP produziert, den zentralen Energiespeicher der Zelle, der u.a. die Energie für die Bewegung der Spermien liefert (34).

Bisher konnten für dieses Enzym zwei Genorte nachgewiesen werden:

Die PGK-1 (Bezeichnung bei der Maus, sonst PGK-A), die bei Säugern in allen somatischen Geweben vorkommt, ist bei der Maus X-chromosomal kodiert (18,19,30). Durch Untersuchungen an Probanden mit einem elektrophoretischen Polymorphismus der PGK-A (5,6) und an Probanden mit einer Enzymdefizienz (37) konnte dies zuerst beim Menschen gezeigt werden. Durch diesen Nachweis wurde das Enzym für die Humangenetik von Bedeutung, da es als Markerenzym zur Untersuchung von Fragen der X-Chromosomen-Inaktivierung, ihrer Reversibilität, Zufälligkeit oder Präferenz verwendet werden kann.

Die PGK-2 (Bezeichnung bei der Maus, sonst PGK-B), die nur in männlichen Keimzellen und dort erst in Spermatiden und Spermatozoen exprimiert wird (33), ist autosomal kodiert. Dies wurde erstmals 1971 von Cooper et al. im Zusammenhang mit Untersuchungen an Känguruhs vermutet (7). Der zugehörige Genort konnte auf Chromosom 17 (8) kurz distal vom D-Ende des Haupt-Histokompatibilitätssystems der Maus lokalisiert werden (41).

Die PGK-B wurde zuerst in Menschen- und Rinderspermatozoen und dann bei allen untersuchten Eutheriern - ca. 15 Spezies - nachgewiesen (38). Sie ist bei diesen wahrscheinlich ein spermienspezifisches Enzym. Dagegen wurde es bei 28 der 43 Marsupialierarten auch im Erythrozyten gefunden. (Bisher nicht bestätigte Ergebnisse (38) ergaben bei zwei Eutheriern, Hund und Fuchs, *Vulpes vulpes*, PGK-B-Aktivität ebenfalls in den Erythrozyten.)

Bei der Maus wurden an Inzuchtstämmen bisher drei genetische Varian-

ten nachgewiesen (38,39), die entsprechend ihrer zunehmenden elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung der Anode mit PGK-2B, PGK-2A und PGK-2C bezeichnet wurden (40). Außer der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit ist seit längerem eine geringere Hitzestabilität der Form 2A im Vergleich zu 1B bekannt (38); darüber hinaus läßt sich eine Aktivität der PGK-2 im Verlauf der Entwicklung der Spermatozoen der Maus erst später nachweisen, als dies bei dem ebenfalls spermienpezifischen Enzym LDH-C4 der Fall ist (20,42, 44). Im Zusammenhang mit Untersuchungen mehrerer spermienpezifischer Enzyme wurde zusätzlich zu genetischen Regulationsmechanismen (11) auch ein hormoneller Einfluß auf die Expression diskutiert (2).

Im Rahmen eines größeren Projektes soll die Lokalisation der PGK-2 in Spermien, ihre funktionelle Bedeutung, der Zeitpunkt der Einschaltung des autosomalen Gens und die Genaktivität in der frühen Embryonalentwicklung untersucht werden; außerdem soll mit monoklonalen Antikörpern gegen PGK-2, bzw. durch aktive Immunisierung mit PGK-2 die Möglichkeit einer immunologisch gesteuerten Fertilitätskontrolle und die Möglichkeit einer immunologisch bedingten Unfruchtbarkeit geprüft werden. Da Spermatozoen erst während der Pubertät im männlichen Organismus auftreten, kann eine Immuntoleranz nicht ohne weiteres vorausgesetzt werden (16).

Dies ist auch von humanmedizinischer Bedeutung. Bereits 1899 wurden erstmals spermienpezifische Antikörper nachgewiesen (25). Zur Antikörperbildung scheint eine pathologische Resorption von Spermien notwendig zu sein, welche im Zusammenhang mit einem Verschuß der ableitenden Samenwege oder bei entzündlichen Erkrankungen der Hoden bzw. samenableitenden Organe auftritt (32). So ließen sich Korrelationen zwischen dem Zeitraum nach Vasektomie und dem Auftreten spermienpezifischer Antikörper zeigen (36).

Dieser immunologische Fragenkomplex ist bereits im Zusammenhang mit dem länger bekannten und intensiv untersuchten, spermienpezifischen Enzym LDH-C4 aufgegriffen worden. Bei weiblichen Mäusen, die mit Anti-Maus-LDH-C4 vom Kaninchen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Kopulation behandelt worden waren, wurde eine signifikante Reduktion der Schwangerschaften beobachtet (12). Dieses Ergebnis konnte allerdings in anderen Versuchen (9,10) nicht bestätigt werden; dabei zeigte sich aber, daß LDH-C4 auf der Oberfläche der Spermien lokalisiert ist. Eine aktive Immunisierung von weibli-

chen Kaninchen mit Mäuse-LDH-C4 ergab im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ebenfalls eine signifikante Reduktion der Schwangerschaften (13).

Leider wurde bei den genannten Versuchen mit LDH-C4 nicht mit spermienspezifischen Enzymen der selben Spezies aktiv immunisiert bzw. nicht mit monoklonalen Antikörpern behandelt. Wie aber Versuche mit spermienspezifischer LDH im homologen System beim Meerschweinchen zeigen (43), ist eine reversible Fertilitätskontrolle durch aktive Immunisierung gegen spermaspezifische Enzyme möglich.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein brauchbares Isolierungsverfahren für PGK-2 aus Mäusehoden und -nebenhoden zu entwickeln, um damit die Voraussetzung für die Beantwortung dieser Fragen zu schaffen. Dabei wird von einem Verfahren zur Isolierung von PGK-1 aus Mäuseskelettmuskel ausgegangen (28).

Methoden

Organe

Zur Organentnahme wurden die Tiere durch Begasen mit CO₂ oder mit Äther getötet. Hoden und Nebenhoden wurden entnommen und während des Präparationsvorganges bei 0°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -24°C. Die Dauer der Lagerung hatte keinen Einfluß auf die Ergebnisse der Isolierung.

Puffer und Dialysen

Puffer A : 50 mM Tris, 5 mM MgSO₄, eingestellt bei 4°C auf pH 8,0 mit HCl konz., entgast

Puffer B : 20 mM Tris, eingestellt bei 4°C auf pH 7,8 mit HCl konz., entgast

Puffer C : 30 mM Ammoniumacetat, 20 mM Histidin, 10 mM Imidazol, 10 mM Tris, 30 mM Glycin

AS-Dialyse: Bei 4°C, für 12 h, in mindestens 100-fachem Überschuß an:
(NH₄)₂SO₄ gesätt. (ca. 4 M), 50 mM Tris, eingestellt bei 4°C auf pH 8,0, entgast

Tris-Dialyse: Bei 4°C, für 2 · 6h, in 500fachem Überschuß an Puffer B

Optischer Test für PGK mit der Rückreaktion

Die Aktivität der PGK sowie die Michaelis-Menten-Konstanten für ATP-Mg und 3-PG wurden in der rückläufigen Glykolysereaktion bestimmt, wie von Bücher 1947 (3) beschrieben. Dabei wurde folgende Testzusammensetzung verwendet:

Standardtestansatz:

100	mM	Tra-HCl, pH 7,6
15	mM	3-PG
0,3	mM	NADH
3,8	mM	ATP
10	mM	MgSO ₄
8	U/ml	GAPDH

Die Messung der Reaktion erfolgte bei 365 nm und 25°C, mit der Einheit 1 Unit = 1 µmol verbrauchtes NADH / min und dem molaren Extinktionskoeffizienten für NADH von $3,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Standardreaktivierung:

Um die Aktivität des Enzyms zu standardisieren und zu stabilisieren, wurde die Probe jeweils in folgendem Ansatz verdünnt und 20 min inkubiert:

100	mM	Tra-HCl, pH 7,6
0,1	%	Rinderserumalbumin
20	mM	DTE

Dies ergab in den meisten Fällen einen Reaktivierungseffekt.

Die Aktivitätsmessungen der einzelnen Fraktionen nach einer Chromatographie erfolgten ohne Standardreaktivierung; diese Werte sind in den Abbildungen wiedergegeben. Demgegenüber wurde zur Berechnung der Werte in den Tabellen nach Standardreaktivierung gemessen. So erklären sich die Aktivitätsunterschiede zwischen Abbildungen und Tabellen.

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt. Mit Fremdprotein verunreinigtes Enzym wurde nach der Biuret-Methode, modifiziert nach Beisenherz et al. (1) (mit $1/10$ des dort angegebenen Ansatzes), bestimmt. Um Fremdfärbung zu vermeiden, wurde dabei mit KCN entfärbt. Das reine Enzym wurde wie bei Krietsch und Bücher 1970 (21,22) angegeben bestimmt. Dabei wurde der

Extinktionskoeffizient $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 7,0$ verwendet, wie er sich für die PGK-Form 1B aus Mäuseskelettmuskel ergeben hatte (20,21).

Affinitäts-Chromatographie

Die PGK adsorbiert wegen ihrer Affinität zum Liganden ATP spezifisch an ATP-ribosyl-adipoyl-dihydrazo-Sepharose (ATP-Sepharose). Dieses Gel wurde wie von Kuntz et al. 1978 beschrieben (23) hergestellt, behandelt und zur Affinitäts-Chromatographie der PGK verwendet.

Da die optimalen Bindungseigenschaften des Gels nur bei 2- bis 5maliger Verwendung desselben erreicht werden, wurde mit neusynthetisiertem Gel zunächst eine Skelettmuskelpräparation durchgeführt und anschließend immer $2/3$ gebrauchtes Gel mit $1/3$ neusynthetisiertem kombiniert verwendet.

Molekularsieb-Chromatographie

Die Chromatographie über das Gel Sephadex G-75 superfine fraktioniert Proteine mit einem Molekulargewicht von 5 000 - 50 000 und liefert deshalb für die Reinigung der PGK günstige Bedingungen. Als Vorbereitung wurde das Gel

- drei Tage im 10fachen Volumen H_2O gequollen und zur Entfernung von kleinen Bruchstücken des Gelmoleküls
- mehrmals, nach Rühren und quantitativer Sedimentation des Gels, der Überstand abdekantiert. Anschliessend wurde es noch einmal
- im 2fachen Volumen Puffer A einen Tag lang gequollen und
- über einer Filternutsche mit Puffer A gewaschen.
- Das Gel wurde im 3fachen Volumen Puffer A aufgenommen, entgast und in die Säule gefüllt.

Während des Packvorganges und der Elution betrug die Durchflußgeschwindigkeit 30 ml/h.

Um die Säule wieder für eine neue Chromatographie vorzubereiten, wurde mit 1 l Puffer A gespült. Nach 4maliger Verwendung mußte sie neu gefüllt werden, um eine gleichbleibende Durchflußgeschwindigkeit zu gewährleisten. Dies erfolgte nach dem oben beschriebenen Vorbereitungsmodus, jedoch ohne die dort genannten Quellvorgänge.

Ionenaustausch-Chromatographie

Für die Ionenaustausch-Chromatographie wurde das Gel DEAE-Sepharose CL-6B verwendet. Dieses Gel ist für pH-Werte zwischen 2 und 9 ein schwacher Anionenaustauscher, der sich oft (bis zu 20mal), ohne die Säule neu zu packen, wiederverwenden läßt. Es besitzt eine große Kapazität für hochmolekulare Biotopolymere (1 400 mg/g bei Albumin) und ist bereits gebrauchsfertig im Handel erhältlich. Da die PGK im neutralen bis alkalischen Bereich als Anion vorliegt, ist dieses Gel zur Auftrennung der drei untersuchten Formen geeignet.

- Das Gel wurde im 5fachen Volumen Puffer B aufgenommen und
- mit 30 ml/h Durchflußgeschwindigkeit gepackt.

Für einen neuen Lauf wurde mit 50fachem Volumen Puffer B gespült.

Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der von Laemmli 1970 (24) beschriebenen Methode durchgeführt. Für Reinheitsuntersuchungen wurden maximal 100 µg Protein in 10 - 100 µl Probenpuffer pro Geltasche aufgetragen, für die Molekulargewichtsbestimmung waren es 20 µg im gleichen Volumen.

Cellogel-Elektrophorese

Zur Untersuchung der Enzymmuster, der prozentualen Verteilung der PGK-Formen vor ihrer Trennung und zur Kontrolle der Trennungsqualität nach DEAE-Sephrose CL-6B wurde die Cellogel-Elektrophorese mit Fluoreszenz-Aktivitätsanfärbung, wie von Bücher et al. 1980 (4) beschrieben, durchgeführt. Zur Untersuchung der prozentualen Verteilung der PGK-Formen erfolgte die quantitative Auswertung der Elektrophorese.

Als zusätzliche Reinheitskontrolle wurden die Gele für ca. 15 h in 0,05% Coomassie in Methanol : H₂O : Eisessig = 5 : 5 : 1 (Coomassie Brillantblaulösung) angefärbt und im gleichen Lösungsmittel entfärbt.

Lagerung der Proteine

Alle Proteine wurden nach dem entsprechenden Präparationsschritt mit einer AS-Dialyse ausgefällt und in diesem Zustand bei 4°C aufbewahrt. Durch die damit erzielten Konzentrationen konnten Aktivitätsverluste weitgehend vermieden werden.

Experimente

Isolierung der PGK

Zur Isolierung der PGK-Formen 2A und 2B aus Mäusehoden und -nebenhoden wurde ein 2-Schritt-Verfahren zur Isolierung von PGK-1 aus Skelettmuskel weiterentwickelt (28,29). Es wurde an mehreren Stellen modifiziert und um einen Schritt erweitert. Die gesamte Isolierung wurde bei 4°C, falls nicht anders angegeben, durchgeführt.

Rohextrakt

Die präparierten Hoden und Nebenhoden wurden

- direkt im tiefgefrorenen Zustand bei Raumtemperatur (22°C) im Küchenmixer (Moulinex 32002) homogenisiert und nach
- Bestimmung des Gewichtes im
- 3fachen Volumen Puffer A bei 4°C aufgenommen.
- Unter Rühren wurde 30 - 45 min extrahiert und anschließend
- 1h bei 100 000 g zentrifugiert.

Im allgemeinen befanden sich nach der Zentrifugation auf dem klaren Rohextrakt eine Lipidschicht in flüssigem und darunter eine in festem Zustand.

- Erstere wurde durch Abpipettieren,
- letztere durch Dekantieren des Zentrifugates über Quarzwolle entfernt.

Der so erhaltenen Rohextrakt sollte klar und fleischfarben sein.

Wird nach der Zentrifugation zügig dekantiert, so kann dies bei Raumtemperatur erfolgen; ein in der Präparation Ungeübter sollte dies im Kühlraum (4°C) tun.

Dann wurden Gesamtprotein und nach Standardreaktivierung gewebespezifische Aktivität und Gesamtaktivität der PGK bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde dabei nach der Biuretmethode gemessen.

Kurz vor dem Beladen der Säule wurde zum Rohextrakt 0,2 mM DTE und, falls zur pH-Korrektur nötig, kristallines Tris in entsprechender Menge hinzugefügt.

Tab. 1: Aktivität im Rohextrakt nach Extraktion

Rohextrakt	n	gewebespez.Akt. (U/g Frischgewicht)	
		$\bar{x}$	s
Hoden	22	70	12
Muskel (1B)	13	270	37

Affinitäts-Chromatographie

Zur Affinitäts-Chromatographie wurde das Gel ATP-Sepharose verwendet. Die verwendete Gelmenge wurde berechnet aus:

Optimal extrahierbarer PGK-Menge:	0,14 mg PGK/g Gewebe *
Bindungskapazität der ATP-Sepharose:	5 mg PGK/ml Gel (23)
Gewicht des verarbeiteten Gewebes:	100 g
Sicherheitsfaktor:	4 (siehe Seite 23)

* 0,14 mg PGK/g Gewebe = 70 U/g Gewebe : 511 U/mg Protein
= gewebespez.Akt. : spez.Akt. nach Sephadex G-75

Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{Gelmenge} = 0,14 \text{ mg PGK/g Gewebe} : 5 \text{ mg PGK/ml Gel} \cdot x \text{ g Gewebe} \cdot 4 ;$$

Für den Standardansatz mit 100 g Gewebe ergab dies das

Gelbettvolumen $11,2 \text{ cm}^3$ ($2,87 \text{ cm}^2 \cdot 3,9 \text{ cm}$).

Die Säule wurde beladen, gespült und gewaschen mit einer

Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml/h und einem

Fraktionsvolumen von 4 - 6 ml.

Die Bindungsfähigkeit des Gels wurde während des Auftragens durch die Bestimmung der PGK-Aktivität im Durchlauf mittels Standardtestansatz kontrolliert. Optimale Bindung der PGK an das Gel ergab sich mit 1- bis 4mal in PGK-Präparationen verwendeter ATP-Sepharose (siehe Seite 8).

Nach Auftragen des Rohextraktes wurde mit

- einem Säulenvolumen Puffer A gespült. Danach ließen sich unspezifisch gebundene Proteine durch Erhöhung der Ionenstärke mit dem
- 1,5fachen Säulenvolumen $0,7 \text{ M NaCl}$ in Puffer A auswaschen, ohne die spezifische Bindung der PGK zu lösen. Dabei war die Aktivität im Eluat im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht von der des Durchlaufs zu unterscheiden. Anschließend wurde noch einmal mit
- einem Säulenvolumen Puffer A gespült.

Die spezifische Elution der PGK erfolgte mit

- 2fachem Säulenvolumen Puffer A mit 50 mM ATP , 80 mM MgSO_4 , $0,2 \text{ mM DTE}$ bei $\text{pH } 8,0$ und 4°C (ATP-Puls) und einer
- Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/h .

Vorsicht: Der Puls hat wegen der sauren Gruppen des ATP einen pH-Wert von 3,5 ; er muß mit NaOH konz. auf 8,0 eingestellt werden. In Gegenwart von DTE verfärbt sich der Puls dabei rosa.

- Anschließend wurde der ATP-Puls mit 1- bis 2fachem Säulenvolumen Puffer A ausgewaschen.

Die Elution der PGK erfolgte dabei durch Konkurrenz des in hoher Konzentra-

tion vorliegenden, freien ATP-Mg-Komplexes mit dem immobilisierten ATP des Gels um den spezifischen Bindungsort des Enzyms.

Das Eluat wurde

- fraktionsweise auf Aktivität getestet,
- Fraktionen mit mehr als 10 U/ml wurden zum Pool vereinigt und
- davon das Gesamtprotein nach der Biuret-Methode, sowie
- die Gesamtaktivität nach Standardreaktivierung bestimmt.

Die Berechnung der Ausbeute und der spezifischen Aktivität erfolgte mit Werten, die nach Standardreaktivierung gemessen worden waren.

Betrug die Ausbeute der ersten PGK-Elution weniger als 70% - wenn etwa die Durchflußgeschwindigkeit nicht rechtzeitig verringert, oder das Hodengewebe mehrmals tiefgefroren und aufgetaut worden war -, so wurde ein zweiter ATP-Puls aufgetragen; dadurch konnte die Gesamtausbeute um 15% bis 20% erhöht werden.

Da die nach Affinitäts-Chromatographie erhaltene PGK noch mit Fremdprotein verunreinigt war, wurde dieses im zweiten Schritt durch eine Molekularsieb-Chromatographie abgetrennt.

Dazu erfolgte direkt im Anschluß an den ersten Schritt eine

- AS-Dialyse zur Volumeneinengung und Stabilisierung des Enzyms und zur Anpassung der unterschiedlichen Proteinmengen, wie sie bei den aufeinanderfolgenden Schritten verwendet wurden.

Molekularsieb-Chromatographie

Um das Protein aus der Affinitäts-Chromatographie, das die gleichen PGK-Formen enthielt, weiter zu reinigen, wurde es aus mehreren Präparationen gesammelt, bis eine Gesamtaktivität von 15 000 - 20 000 U erreicht war.

Als Gel wurde Sephadex G-75 superfine bei einem

Gelbettvolumen von 1 260 cm³ (12,6 cm² · 100 cm) verwendet. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 30 ml/h mit Puffer A, das Fraktionsvolumen 8 - 10 ml.

- Das abzentrifugierte Protein (43 000 g, 15 min) wurde
- in 10 - 13 ml Puffer A gelöst, sodaß sich eine Aktivität von ungefähr 1 500 U/ml ergab. Dieses Volumen wurde noch einmal wie oben beschrieben
- zentrifugiert, um nicht gelöste Bestandteile zu entfernen, und
- vorsichtig auf das Gel pipettiert. Nach dem Einlaufen der Probe wurde
- der Pipettiervorgang 2mal mit dem doppelten Probenvolumen Puffer A wiederholt (das erste Mal sollte der Puffer genauso wie vorher die Probe bis auf Gelniveau einlaufen)
- und danach Puffer A an die Säule angeschlossen.

Es ergaben sich zwei Protein-Pools (siehe Abb. 1) und ein ATP-Pool; letzterer wurde als dritter Pool weit hinter den Proteinen eluiert. Um die Proteinmaxima zu identifizieren, wurde fraktionsweise die

- Extinktion bei 280 nm und die PGK-Aktivität gemessen. Das zweite Maxi-

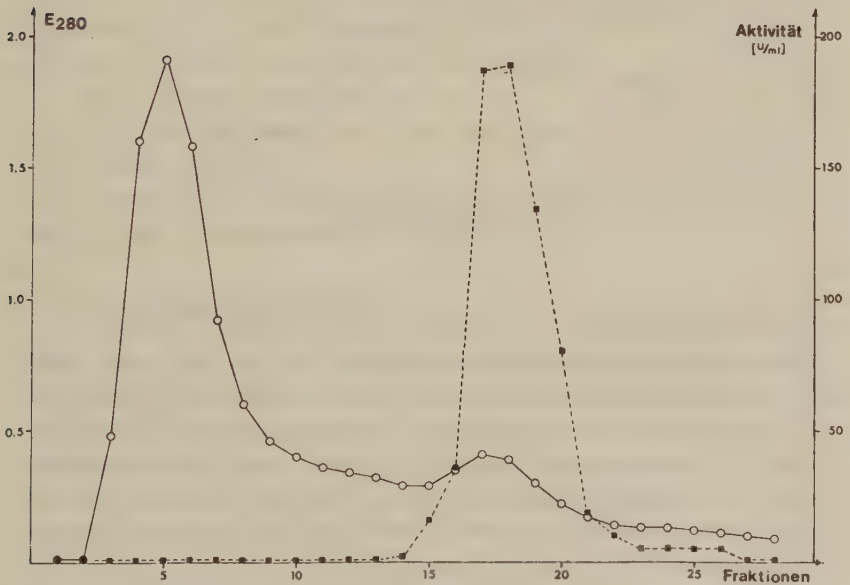


Abb. 1 : Elutionsdiagramm nach G-75 superfine.

—○— : E₂₈₀; -●- - : PGK-Aktivität;

mum in $E_{280\text{ nm}}$ enthielt die PGK.

Zum Abschluß wurden

- die spezifische Aktivität aus der Spitzenfraktion und bezüglich des PGK-Pools
- Volumen, Gesamtaktivität nach Standardreaktivierung, Gesamtprotein über $E_{280\text{ nm}}$, und
- die Ausbeute dieses Schrittes bestimmt.
- Das Protein wurde in einer AS-Dialyse ausgefällt.

Für die AS-Dialyse nach Sephadex G-75 durfte nicht das gleiche Dialysebad wie nach ATP-Sepharose verwendet werden, da die PGK nach Sephadex G-75 vom ATP des Pulses befreit war.

Da der Tyrosin- und Tryptophan-Gehalt der PGK-Formen 2B und 2A noch nicht bekannt war, wurde zur vorläufigen Berechnung der Proteinkonzentrationen bei diesen Formen ebenfalls der

$$\text{Extinktionskoeffizient } E_{280\text{ nm}}^{1\%} = 7,0$$

der Form 1B verwendet.

Reinheitskontrolle

Die Reinheit des präparierten Proteins wurde mittels SDS-PAGE getestet.

Nach den beiden oben beschriebenen Schritten war nur noch eine Bande elektrophoretisch nachweisbar. Die Probe konnte folglich nur Proteine mit dem Molekulargewicht der PGK enthalten, die durch die unspezifische Elution von der ATP-Sepharose nicht, durch die spezifische jedoch schon auswaschbar waren. Eine Cellogel-Elektrophorese, die mit Coomassie Brilliantblaulösung angefärbt wurde, zeigte, daß nur noch die drei, den PGK-Isoenzymen entsprechenden Banden in der Probe vorhanden waren.

Zum Schluß mußten die verschiedenen PGK-Formen voneinander getrennt werden. Dies geschah im dritten Schritt mit einer Ionenaustausch-Chromatographie.

Ionenaustausch-Chromatographie

Für die Standardpräparation von 3 500 - 4 000 U Gesamtaktivität wurde der Anionenaustauscher DEAE-Sepharose CL-6B mit einem Gelbettvolumen von 4,9 cm³ (0,78 cm² · 6,3 cm) verwendet.

Vor Beginn wurde die Säule mit

- dem 50fachen Säulenvolumen Puffer B äquilibriert.

Das Enzym wurde vor dem Auftragen auf die Säule folgendermaßen behandelt: Zunächst wurde eine Tris-Dialyse durchgeführt; dazu wurde das gefällte Protein aus der AS-Lösung

- 15 min mit 43 000 g abzentrifugiert, das Sediment in
- 0,4 ml Puffer B mit 30 mM DTE gelöst und über Nacht in
- 1 l Puffer B + DTE dialysiert, sodaß die Endkonzentration an DTE 0,2 mM betrug.

Dadurch gelang es, das Enzym optimal in Lösung zu bringen und Ausbeuten bis zu 90% bei diesem Schritt zu erreichen.

Nach der Tris-Dialyse wurden nicht gelöste Bestandteile

- 10 min mit 29 000 g abzentrifugiert und
- vom Überstand das Gesamtprotein und nach Standardreaktivierung die Gesamtaktivität bestimmt.

Die Proteinbestimmung erfolgte nicht bei jeder Präparation, da dies zu einer unerwünschten Volumenzunahme der Probe geführt hätte.

- Die Proteinlösung und anschließend
- 2mal das einfache Probenvolumen Puffer B wurden aufgetragen, wobei die Probe und das erste Puffervolumen auf Gelniveau einlaufen sollten, und ein
- Tris-Gradient linear von 20 - 80 mM Tris, pH 7,8 bei 4°C, mit einem Gesamtvolumen von 80 ml angeschlossen.

Eluiert wurde mit einer

Durchflußgeschwindigkeit von 5,7 ml/h und einem Fraktionsvolumen von 0,7 ml.

Zur Identifizierung der einzelnen PGK-Formen wurde zunächst

- vorgegangen wie nach Sephadex G-75.

Da sich drei Protein- und Aktivitätsgipfel ergaben, wurden bezüglich der

Gipfel

- drei Eluatintervalle getrennt vereinigt und
- jeder der drei Pools einzeln wie der PGK-Pool nach Sephadex G-75 behandelt.

Um das Protein in einer AS-Dialyse sicher fällen zu können, wurden die Pools mit weniger als 100 U/ml zunächst

- mit Polyäthylenglykol (20 000 MG) in Trockensubstanz eingeeengt:

Dazu wurden die entsprechenden Pools in Dialyseschläuche gefüllt und diese mit Polyäthylenglykol-Trockensubstanz solange umgeben, bis - nach Augenschein - eine Volumeneinengung erreicht war, die einer Aktivitätsanreicherung auf mind. 100 U/ml entsprach.

Die Identifikation der einzelnen PGK-Formen erfolgte mit einer Cellogelelektrophorese (siehe nächster Abschnitt: Kontrolle der Trennungsqualität).

Wie die Abb. 2 zeigt, lief die PGK-Form 1B bei 20 mM Tris, pH 7,8 und 4°C ohne gebunden zu werden durch, während die Spitzenfraktion der Form 2B bei ca. 35 mM Tris, die der Form 2A bei ca. 44 mM Tris eluiert wurde.

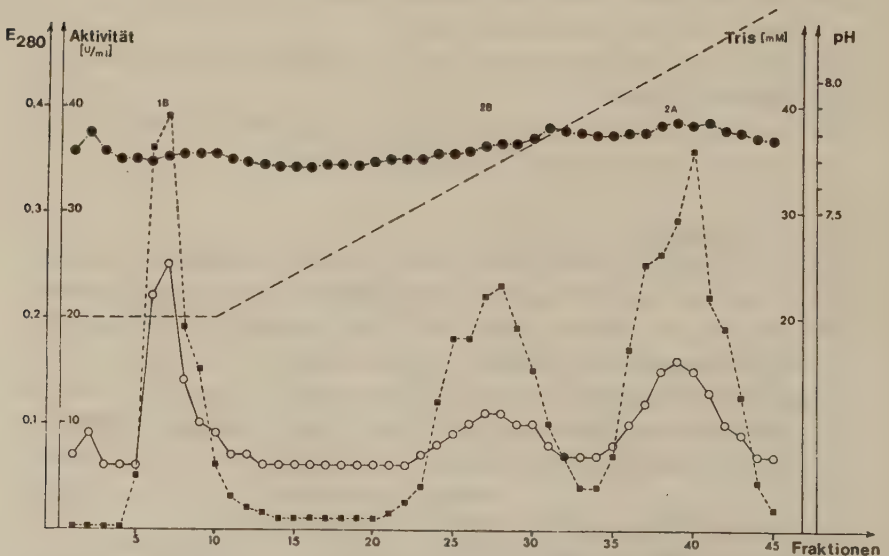


Abb. 2 : Elutionsdiagramm nach DEAE-Sephadose CL-6B.

—○— : E₂₈₀ nm; - - - : Aktivität; —●— : pH; - - - : Tris-Konzentration

Kontrolle der Trennungsqualität

Die Kontrolle der Trennungsqualität erfolgte durch eine Cellogel-Elektrophorese mit PGK-Fluoreszenz-Aktivitätsanfärbung.

Der erste Protein- und Aktivitätsgipfel nach DEAE-Sephrose CL-6B enthielt nur eine Bande, die der Form 1B entsprach; der zweite und dritte Gipfel waren 1B-frei, sie enthielten die Formen 2B und 2A. Wurden die letzten beiden Gipfel jedoch nicht mit einem entsprechend großen Abstand (ca. 5 - 8 Fraktionen) gepoolt, so zeigte die Elektrophorese beider Pools noch jeweils eine dünne Bande der anderen spermienspezifischen Form.

Ergebnis

Das beschriebene Verfahren ermöglichte es, die spermienspezifischen Formen vollständig von der somatischen Form der PGK abzutrennen. Die Trennung von 2A und 2B voneinander aus einem Gemisch aller drei Formen war nicht vollständig, sodaß die Reinheitsanforderungen für eine spezifische Antikörperproduktion i. a. nicht erfüllt waren. Dazu war es nötig, den Teil, der die Formen 2B und 2A zusammen enthielt, zu rechromatographieren oder Material von 2A- oder 2B-homozygoten Stämmen zu verwenden.

Alle Werte in den Tabellen ergaben sich dadurch, daß auch das Intervall zwischen den Pools von 2B und 2A mit in die Berechnung einbezogen wurde. Wurde es weggelassen, so waren die Ausbeuten um etwa 5 - 10% niedriger.

Tab. 2: Zusammenfassung der Ionenaustausch-Chromatographien.

Berechnung mit n = 8	V (ml)		Akt. (U/ml)		Protein (mg)		Spez.Akt. (U/mg)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Ausgangsmaterial PGK n. G-75 in AS	8,5	3,5	3200	1100			280*	60
			100%					
n. Zentrifugation und Tris-Dialyse	0,58	0,09	2850	1060				
Ausbeute			85%	8%				
nach IT (% bez. Gesamt n. IT)								
Gesamt (1B,2B,2A)	21,8	4,2	2230	1020	4,33	1,74	510	70
1B	23%	6%	46%	5%	33%	4%	710	100
2B	35%	4%	24%	9%	29%	6%	410	100
2A	42%	6%	30%	9%	37%	8%	410	110
Ausbeute			80%	11%				
nach AS-Dialyse (% bez. Gesamt n. AS)								
Gesamt (1B,2B,2A)	5,8	0,7	1790	1020				
1B	25%	8%	48%	8%				
2B	35%	9%	25%	9%				
2A	38%	19%	27%	12%				
Ausbeute			79%	17%				
Ausbeute über alle 3 Schritte			54%	19%				

* : Berechnung aus 9 Sephadex G-75 - Läufen (siehe Seite 21, Tab. 3)

Tab. 3: Zusammenfassung der Gesamtisolierung von Hoden-PGK (1B,2B,2A-Mischung)

Isolierungs- schritt	n ¹⁾	Spez.Akt. (U/mg)		Ausbeute bez. Akt. (%)		
		$\bar{x}$	s	Einzelschritt*		Gesamt**
				$\bar{x}$	s	$\bar{x}$
Rohextrakt ²⁾	4	2,3	0,3			100
1. ATP-Sepharose ²⁾	13	60 ³⁾	25 ³⁾	81	10	
AS-Dialyse	6			97	13	
Gesamt***	6			82	11	82
2. G-75	9	280	60	79	15	
AS-Dialyse	5			105	22	
Gesamt***	5			79	6	65
3. Tris-Dialyse	8			85	8	
DEAE CL-6B	8	510	70	80	11	44
AS-Dialyse	8			79	17	
DEAE CL-6B + AS	8			62	17	
Gesamt***	8			54	19	35

* : 100% = Aktivität vor dem jeweiligen Einzelschritt, der in der Zelle dargestellt ist.

** : 100% = Aktivität im Rohextrakt;

*** : 100% = Aktivität vor dem jeweiligen Präparationsschritt, dh direkt vor ATP-Sepharose, Sephadex G-75 superfine oder Tris-Dialyse;

1) : Die Fallzahlen sind nicht überall gleich groß, da auf mehrere ATP-Sepharose-Präparationen ein Sephadex-G-75-superfine-Lauf, auf einen solchen mehrere Ionenaustauscherläufe folgen (wegen verschieden großer Proteinmengen);

2) : Proteinbestimmung nach Biuret;

3) : n = 3;

Formenspezifische Aktivitätsverteilung vor und nach der Isolierung

Um die formenspezifische Aktivitätsverteilung vor und nach der Isolierung der PGK zu untersuchen, mußten zwei verschiedene Aktivitätsbestimmungsmethoden verwendet werden:

Vor DEAE-Sepharose CL-6B, d.h. vor Auftrennung der drei PGK-Formen, die quantitative Auswertung der Cellogel-Elektrophorese, nachher der optische Test für PGK mit der Rückreaktion.

Die Gleichwertigkeit der beiden Methoden wurde von Bücher 1980 (4) gezeigt.

Für die Bestimmung der Aktivitätsverteilung vor der Isolierung wurde aus einzelnen Hoden ein Rohextrakt im Eisbad mittels eines Plotter Apparates gewonnen. Zu jeder Gewebeprobe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und die Mittelwerte daraus für die Berechnung der Daten in Tab. 4 verwendet.

Tab. 4: Formenspezifische Aktivitätsverteilung vor und nach der Isolierung

		1B (%)*		2B (%)*		2A (%)*		Art der Bestimm.
	n	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	
Rohextrakt aus:								
C3H/101	3	32	3	35	1	32	2	quantit. Auswert. der Cello-gel-Elpho
101	2	37	8	-	-	63	8	
nach DEAE								
CL-6B + AS:	8	48	8	25	9	27	12	opt.Test

* : 100% = Summe der Aktivitäten aller drei Formen nach dem jeweiligen Schritt.

Ergebnis

Die Aktivitätsverteilung zwischen den drei PGK-Formen änderte sich im Verlauf der Isolierung von 1B:2B:2A = 1:1:1 nach 2:1:1; damit erwiesen sich die spermienspezifischen Formen als weniger stabil gegenüber dem gesamten Isolierungsverfahren. Im Rohextrakt betrug der Anteil der spermienspezifischen Formen an der Gesamtaktivität bei beiden untersuchten Stämmen etwa 2/3.

Erläuterungen zur Isolierung und Beschreibung der Vorversuche

Rohextrakt

Bei Vorversuchen mit Skelettmuskel hatte sich gezeigt, daß bei direkter Verarbeitung des tiefgefrorenen Gewebes im Vergleich zu einem anderen Verfahren (28) die gewebespezifische Aktivität um durchschnittlich $1/3$ gesteigert werden konnte.

Bei Zentrifugation mit niedrigerer Beschleunigung und/oder kürzerer Laufzeit war keine befriedigende Abtrennung des Lipidanteiles zu erreichen; eine höhere Beschleunigung und/oder längere Laufzeit erwiesen sich als überflüssig bezüglich Trennungsqualität und Ausbeute. Andererseits ergab zwar ein zweistufiges Vorgehen (24 000 g / 43 000 g) eine um 30% höhere gewebespezifische Aktivität (93 U/g Gewebe), jedoch betrug der Aktivitätsverlust während der Präparation 50%.

Dies könnte auf vermehrt freigesetzte proteolytische Enzyme bzw. auf unterschiedliche Qualität der Lipidabtrennung zurückzuführen sein. Außerdem ist dies ein Hinweis darauf, daß die in vivo vorliegende gewebespezifische Aktivität höher ist als die in diesem Isolierungsverfahren erreichte. Im Vergleich zur Muskelpräparation ergab sich für den Hoden nur $1/4$ bis $1/3$ der gewebespezifischen Aktivität im Rohextrakt (siehe Seite 12, Tab. 1). Damit entspricht die spezifische Aktivität von Hoden und Nebenhoden ungefähr derjenigen der Leber, die gewebespezifische Aktivität dieser Organe derjenigen der Milz (28).

Da am Ende des zuerst beschriebenen Zentrifugationsverfahrens noch gewebegebundene Aktivität nachweisbar war, wurde das Sediment nachextrahiert. Dabei konnte aber lediglich maximal 5% Aktivitätsgewinn erzielt werden.

Eine pH-Änderung von bis zu 0,8 pH-Einheiten während der Extraktion und eine Verfärbung des Rohextraktes ins Braune im weiteren Verlauf der Verarbeitung waren bezüglich Aktivität und Ausbeute bedeutungslos.

Affinitäts-Chromatographie

Der Sicherheitsfaktor für die Berechnung der nötigen Gelmenge bei der Affinitäts-Chromatographie wurde im Vergleich zur Muskelpräparation (28)

von 1,5 auf 4 vergrößert, da es nicht immer möglich war, den Lipidanteil des Rohextraktes restlos zu entfernen, wodurch die Adsorption der PGK an das Gel behindert worden wäre. Eine zusätzliche Verdoppelung des Gelbettvolumens ließ die durchschnittliche Bindung an die Säule von 85% der aufgetragenen PGK-Aktivität auf 90% ansteigen.

War das Gel in einer Ribonukleasepräparation aus Seminalplasma verwendet und anschließend mit dem üblichen Verfahren (23) regeneriert worden, so verdoppelte sich die im Durchlauf befindliche Aktivität mit jeder neuen Wiederverwendung des Gels.

Auch mit neusynthetisierter ATP-Sepharose allein waren keine befriedigenden Ausbeuten zu erzielen. Es ist deshalb zu empfehlen, die erste Präparation auf einem neuen Gel mit einem weniger wertvollen Material (Mäuseskettmuskel) durchzuführen.

Der entscheidende Schritt in der Modifikation des Verfahrens zur Muskelpräparation für die Verwendung in Hodenpräparationen war die Zugabe von 0,2 mM DTE zu Rohextrakt und Puls, um dem Enzym für die Zeitdauer, während der es nicht an den ATP-Mg-Liganden gebunden vorliegt, seine Aktivität zu erhalten, d.h. dem Enzym die Möglichkeit zu erhalten, mit diesem Liganden eine Bindung einzugehen. Ohne DTE konnte nur etwa die Hälfte der Ausgangsaktivität gereinigt im Pool wiedergewonnen werden; der Rest befand sich im Durchlauf oder war inaktiviert worden (Siehe Tab. 5).

Die Erhöhung der Molarität des Pulses im Vergleich zur Muskelpräparation ergab eine Verringerung des Pulsvolumens um 15-20%. Änderungen des pH-Werts zwischen 7,0 und 8,0 hatten keinen Einfluß auf Bindungsfähigkeit und Ausbeute.

Tab. 5: Aktivität bei Hodenpräparationen nach ATP-Sepharose.

	Akt. (%) ohne DTE*			Akt. (%) mit DTE*		
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s
Durchlauf	5	30	20	13	7	3
Pool	5	44	21	13	81	10

*: 100% = Aktivität im Rohextrakt.

Molekularsieb-Chromatographie

Im Vergleich zu den Muskelpräparationen (siehe Seite 49, Tab. 14) war der PGK-Pool nach ATP-Sepharose mit einem 4mal größeren Anteil an Fremdprotein verunreinigt. Trotzdem war in den meisten Fällen durch das beschriebene Verfahren eine befriedigende Reinigung zu erzielen. Ergab die SDS-PAGE keine einzelne Bande für die PGK, so wurde ein zweiter Sephadex-G-75-superfine-Lauf angeschlossen.

Es fiel auf, daß die durchschnittlichen Ausbeuten bei den Hodenpräparationen leicht unter denen bei den Muskelpräparationen mit dem gleichen Verfahren lagen und daß bei beiden durch die AS-Dialyse die Streuung der Ausbeuten nach Sephadex G-75 geringer wurde.

Ionenaustausch-Chromatographie

Zunächst war die Elution mit einem NaCl-Gradienten, linear von 0-100 mM in 20 mM Tris, pH 7,8 bei 4°C, mit einem Gesamtvolumen von 130 ml und einer Durchlaufgeschwindigkeit von 5,7 ml/h versucht worden. Die ersten erfolgreichen Läufe ließen sich nicht reproduzieren, da sich der größte Teil des Proteins nicht mehr vom Ionenaustauschergel nach PGK-Formen getrennt ablösen ließ und gleichzeitig die enzymatische Aktivität verlor.

Versuche zum Bindungsverhalten

Da eine oxidative Zerstörung des Enzyms vermutet wurde, wurde der gesamte Lauf in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Dies brachte keine Verbesserung.

Versuche Gruppe I

Als nächstes wurde eine Säule mit DEAE-Sepharose CL-6B, Gelbettvolumen 23,8 (0,95 cm² · 25 cm), den Abmessungen der

ersten erfolgreichen Läufe,

- mit 100 ml 0,5 M NaCl in Puffer B (Nacheluat des vorhergehenden Laufes) gespült,
- mit 150 ml Puffer B äquilibriert und anschließend
- mit einer Probe der PGK-Form 1B beladen. Die Durchlaufgeschwindigkeit von 5,7 ml/h wurde bei allen weiteren Versuchen beibehalten.

Nachdem im Anschluß an die Probe ein

- doppelt so großes Volumen Puffer B aufgetragen worden war, wurde ein
- Gradient linear von 0-100 mM NaCl in Puffer B, Gesamtvolumen 145 ml angeschlossen.

Dieser Versuch wurde auf der gleichen Säule zweimal wiederholt. Die Messung von Volumen, Aktivität und Extinktion bei 280 nm und die Berechnung der spezifischen Aktivität in Probe und Pool, bzw. der Ausbeute ergaben die Werte in Tab. 6 und Abb. 3.

Ergebnis

Protein und Aktivität gingen beim Lauf über das Gel im gleichen Prozentsatz verloren; davon waren etwa 2/3 des Proteins und 1/10 der Aktivität im NaCl-Nacheluat wiederzufinden.

Ein Teil des Enzyms war also derart an das Gel gebunden, daß er nur inaktiv eluiert werden konnte.

Tab. 6: Vorversuche Gruppe I auf DEAE-Sepharose CL-6B.

Versuchsnummer	Probe	Ausbeute			Pool
		Spez. Akt. (U/mg)	Akt. (%)	Protein (%)	
IT6	862		74	67	950
IT7	702		63	63	695
IT8	631		51	56	666

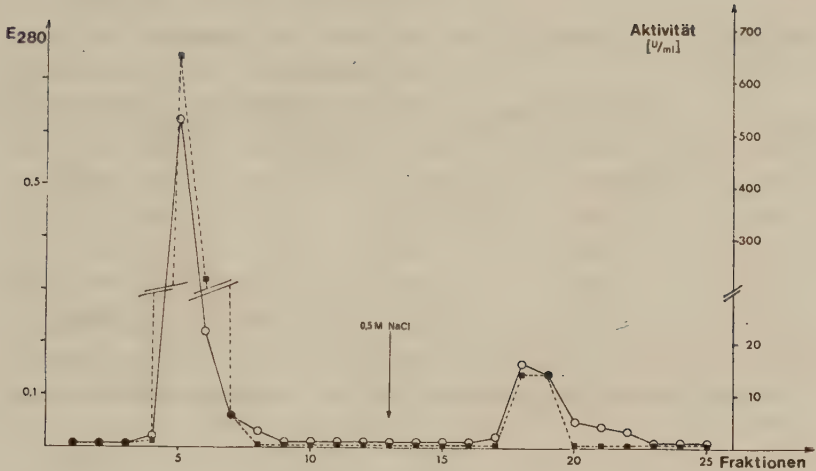


Abb. 3 : Elutionsdiagramm von IT6.

—○— : E280 nm; ---●--- : Aktivität;

Versuche Gruppe II

Nach dem Versuch IT8 wurde die 0,5 M NaCl-Spülung weggelassen und lediglich

- mit 300 ml Puffer B gespült.

Die anderen Versuchsbedingungen und ebenso die Messungen und Berechnungen blieben die gleichen. Die entsprechenden Werte finden sich in Tab. 7.

Ergebnis

Ohne NaCl-Spülung ergaben sich keine wesentlichen Aktivitätsverluste auf DEAE-Sephrose CL-6B, sondern, wie die Versuche IT10 und IT11 zeigen, sogar absolute Aktivitätszunahmen; dies entspricht einem Reaktivierungseffekt. Da sich gleichzeitig etwa 30% des Proteins nicht mit dem Gradienten eluieren ließen, muß es sich dabei um bereits vor dem Austauscherlauf inaktives Enzym handeln (siehe Tab. 8).

Tab. 7: Vorversuche Gruppe II auf DEAE-Sepharose CL-6B.

Versuchs- nummer	Probe	Ausbeute			Pool
		Spez. Akt. (U/mg)	Akt. (%)	Protein (%)	Spez.Akt.(U/mg)
IT 9 *	539	99	68		783
IT10 *	519	117	65		933
IT11	597	113	88		992
IT12	548	89	60		816
IT13	625	91	64		883

*: Es wurde Protein aufgetragen, das bereits einmal über das Ionenaustauschergel gelaufen war.

Tab. 8: Bindungsverhalten der PGK-Form 1B auf DEAE-Sepharose CL-6B (Durchschnittswerte).

Versuchs- gruppe	n	Ausbeute (%)					
		Akt.		Protein		Spez. Akt.	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
I	3	65	8	62	6	105	6
II	5	106	20	69	11	156	16

Die stärkere Bindung dieser Proteinfraction könnte mit Konformationsänderungen des Proteins zusammenhängen, die gleichzeitig zum Verlust der enzymatischen Aktivität führen. Eine Verunreinigung mit anderen Proteinen des gleichen Molekulargewichtes wie dem der PGK kann wegen IT9 und IT10 ausgeschlossen werden, da es sehr unwahrscheinlich ist, daß sich solche Fremdproteine auch gegenüber DEAE-Sepharose CL-6B genauso wie die PGK verhalten.

Festzuhalten ist, daß sich mit Ausnahme von IT6 und IT7 eine wesentlich höhere spezifische Aktivität der PGK ergab als unter den zur Bestimmung der spezifischen Aktivität üblichen Bedingungen. Es ergaben sich Zunahmen um bis zu 50% gegenüber dem Wert von 650 U/mg (29).

Die tatsächliche spezifische Aktivität lag deshalb mindestens bei 1000 U/mg und die niedrigeren Werte erklärten sich durch eine lagerungs- oder präparationsbedingte Inaktivierung, welche nicht durch eine DTE-Reaktivierung rückgängig zu machen war.

Folgerung

Die bisherigen Versuche auf DEAE-Sepharose CL-6B zeigten, daß es ohne Vorbehandlung des Gels mit NaCl möglich war, die gesamte Aktivität der PGK-Form 1B zu eluieren und daß eine Reaktivierung der enzymatischen Aktivität erfolgte. Dies ließ eine Wechselwirkung der Na⁺- und Cl⁻-Ionen mit den Gelmolekülen vermuten, die die Bindungsfähigkeit der letzteren beeinflusste. Weil dabei auch ein Einfluß auf den pH-Wert zu erwarten war, wurde bei den nächsten Versuchen dieser Parameter im Verlauf der Elution kontrolliert.

pH-abhängige Elution

Versuch 1

Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen wurden das

Gelbettvolumen auf 4,9 cm³ (0,78 cm² · 6,3 cm) verringert, um mit kleineren Proteinmengen arbeiten zu können, eine Mischung der

- PGK-Formen 1B, 2B und 2A, wie sie aus Hodengewebe isoliert wurde, aufgetragen und im Eluat zusätzlich zu den üblichen Messungen
- der pH-Wert fraktionsweise bestimmt.

Als nach acht Fraktionen kein Protein in der erwarteten Menge eluiert worden war, wurde der NaCl-Gradient zunächst durch eine

- konstante NaCl-Konzentration von 100 mM,
- später ab Fraktion 18 durch eine von 500 mM ersetzt (siehe Abb. 4).

Ergebnis

Jedesmal, nachdem die NaCl-Konzentration erhöht worden war, konnte inaktives Enzym eluiert werden. Eine elektrophoretische Untersuchung (Cetlogel) ergab, daß nur bedingt spezifisch eluiert worden war:

Die erste deutliche Extinktions-Spitze enthielt die Formen 2B und 2A, die zweite nur 2B; 1B-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden.

Eine 6stündige Reaktivierung der Fraktion 12 ergab eine Aktivität von 108 U/ml.

Während des Gradientenlaufs war der pH-Wert konstant. Als bei Fraktion 9 100 mM NaCl angeschlossen wurden, was einem Konzentrationsprung von etwa 90 mM entsprach, stieg nach 2 Fraktionen der

=> pH-Wert steil um 0,7 Einheiten an, um anschließend wieder genauso steil und weit abzufallen.

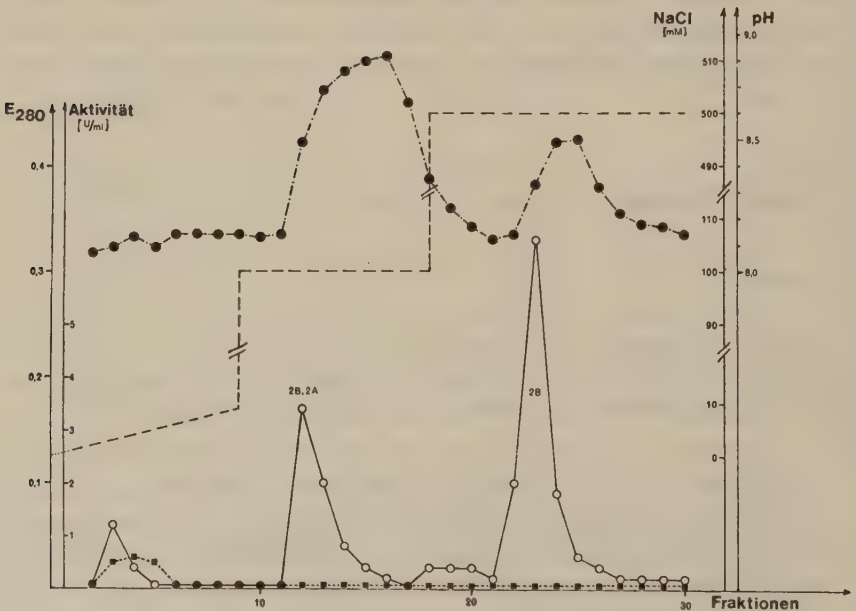


Abb. 4: Elutionsdiagramm der PGK-Formen 1B, 2B und 2A auf DEAE-Sephacelose CL-6B mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen.

—○— : $E_{280\text{ nm}}$; ---■--- : Aktivität; ----○---- : NaCl-Konzentration; -●- : pH

Die zweite Konzentrationserhöhung um

400 mM NaCl ergab nach 4 Fraktionen nur einen

=> pH-Anstieg der gleichen Form um 0,4 Einheiten.

Beim ersten pH-Anstieg begann mit diesem gleichzeitig die Elution inaktiver PGK und endete bereits in der Anstiegsphase. Das gleiche Verhalten zeigte sich beim zweiten pH-Anstieg mit leichter Verschiebung.

Folgerung

Die pH-Schwankungen wurden vom NaCl-Konzentrationsanstieg ausgelöst und beeinflussten die Elution der PGK. Die Amplitude der pH-Schwankungen war auch von der Vorbehandlung des Gels abhängig.

Um die pH-Schwankungen im Eluat genauer beschreiben und erklären zu können, wurden die Versuche 2 und 3 durchgeführt:

Versuch 2

Die Säule mit DEAE-Sepharose CL-6B aus den vorangegangenen Versuchen wurde

- mit 50-fachem Säulenvolumen 30 mM Tris, pH 8,3 bei 4°C, äquilibriert.
- Im weiteren Verlauf wurde fraktionsweise der pH-Wert gemessen.

Dann wurde

- 130 mM Tris, pH 8,3 bei 4°C, aufgetragen,
- nach 16 Fraktionen erneut mit 30 mM Tris, pH 8,3 bei 4°C, gespült und
- nach weiteren 30 Fraktionen 100 mM NaCl in 30 mM Tris, pH 8,2 bei 4°C, aufgetragen (siehe Abb. 5).

Ergebnis

Es ergab sich nach dem Tris-Konzentrationsanstieg um 100 mM

- => ein vorübergehender pH-Anstieg um 0,3 Einheiten wie im vorhergehenden Versuch mit daran anschließendem, konstantem pH-Verlauf auf dem Ausgangsniveau,

nach dem Tris-Konzentrationsabfall um 100 mM

- => ein dazu symmetrischer, etwa gleichgroßer, vorübergehender pH-Abfall. Daran anschließend blieb der pH-Wert ebenfalls auf dem Ausgangsniveau konstant.

Nach dem NaCl-Konzentrationsanstieg um 100 mM kommt es wieder zu einem

=> pH-Anstieg der gleichen Form, jedoch um 0,5 Einheiten.

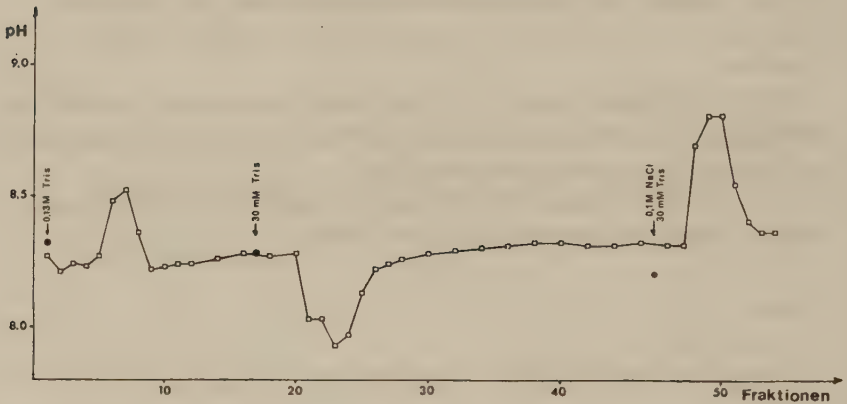


Abb. 5: pH-Verlauf auf DEAE-Sepharose CL-6B bei 100 mM Tris- und NaCl-Konzentrationsprüngen.

• : pH des Puffers vor dem Lauf über die Säule

Versuch 3

Unter den Bedingungen wie bei Versuch 2, jedoch mit

- 40 mM Tris, pH 7,8 bei 4°C, wurde ein
- Tris-Gradient, linear von 40 - 200 mM Tris, Gesamtvolumen 65 ml, angeschlossen; danach wurde
- mit 40 mM Tris erneut gespült.

Ergebnis

Während des Gradientenlaufs ergab sich ein

=> nahezu konstanter pH-Wert

und kurz nach Beginn der Spülung mit 40 mM Tris (entspricht einer Tris-Konzentrationsdifferenz von 140 mM)

=> einen vorübergehenden pH-Abfall der bekannten Form um 0,4 pH-Einheiten.

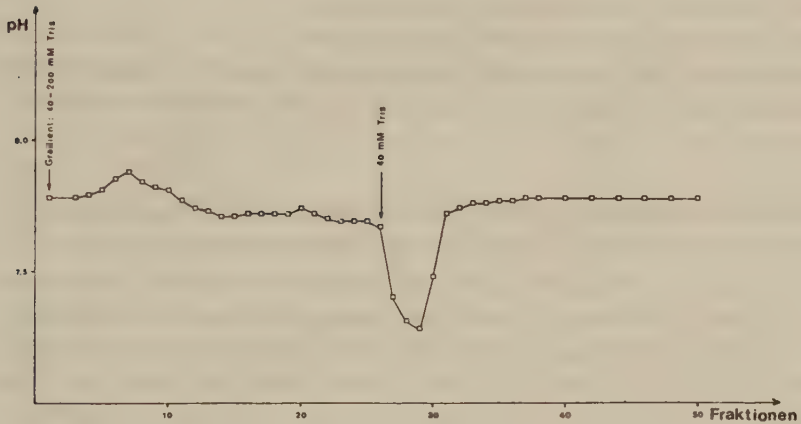


Abb. 6: pH-Verlauf auf DEAE-Sepharose CL-6B mit Tris-Gradient.

Es ergab sich also insgesamt:

- Jede un stetige Änderung der Ionenstärke hatte eine pH-Änderung im Eluat zur Folge.
- Die pH-Änderung war bei Verwendung von Tris- und Cl-Ionen deutlich geringer als bei Na- und Cl-Ionen.
- Bei Verwendung eines stetigen Tris-Gradienten blieb der pH-Wert im Eluat bis auf relativ kleine Schwankungen konstant.

Ergebnisse der Versuche auf DEAE-Sepharose CL-6B

Da man davon ausgehen muß, daß der pH-Verlauf im Eluat die pH-Änderungen im Mikromilieu der gesamten Säule integrativ wiedergibt, kann aus

dem Verhalten des im Eluat gemessenen Wertes nicht auf ein gleiches an jedem beliebigen Punkt des Gelbettes geschlossen werden. Eine meßbare und für eine theoretische Erklärung brauchbare pH-Änderung im Eluat ergibt sich erst, wenn genügend viele, gleichartige Mikromilieuänderungen durch die entsprechenden Versuchsbedingungen erzwungen werden. Dies war bei unstetigen Konzentrationsänderungen um 100 mM der Fall.

Da sich durch einen 100 mM-Tris-Sprung eine geringere pH-Änderung im Eluat ergab als durch einen 100 mM-NaCl-Sprung, konnte auf analoge Unterschiede im Mikromilieu bei Verwendung linearer Gradienten geschlossen werden.

Die H^+ -Ionenkonzentrationsänderung im Eluat als Folge einer Änderung der Ionenkonzentration des Gradienten läßt sich folgendermaßen erklären:

Die funktionelle Gruppe des Anionenaustauschers DEAE-Sephrose CL-6B wird durch einen Diäthylaminoäthyl-Rest gebildet, wobei das N-Atom die anionische Bindungsstelle darstellt. Im äquilibrierten Zustand des Gels sind zum Teil OH^- -Ionen an dieser Stelle des Moleküls angelagert. Enthält nun die flüssige Phase des Austauschersystems Cl^- -Ionen, so treten diese mit den OH^- -Ionen in Konkurrenz um die anionische Bindungsstelle. Die dadurch vom Gel freigesetzten OH^- -Ionen entziehen aber dem Puffer H^+ -Ionen, um mit diesen H_2O zu bilden. Als Folge davon steigt der pH-Wert.

Nimmt die Cl^- -Ionenkonzentration in der flüssigen Phase wieder ab, so können wieder OH^- -Ionen gebunden werden, der pH-Wert sinkt.

Das amphotere PGK-Molekül liegt beim verwendeten pH-Wert von 7,8 als Anion vor. Deshalb nimmt es ebenfalls an der Konkurrenz um die anionische Bindungsstelle des Austauschergels teil. Wenn die beschriebene pH-Änderung nicht abgepuffert wird, treten während der Elution zwei gegensätzliche Effekte auf:

- Die erhöhte Cl^- -Ionenkonzentration soll eine Ablösung des Proteins vom Austauscher bewirken, andererseits
- nimmt in Folge der pH-Werterhöhung die negative Nettoladung des Proteinmoleküls dem Betrag nach zu und bedingt eine stärkere Bindung an das Gel.

Die Überlagerung dieser beiden Effekte stört den gewünschten selektiven Elu-

tionsprozess und inaktiviert das Enzym, wie die entsprechenden Versuche gezeigt haben. Dies kann vermieden werden, wenn mit steigender Cl^- -Ionenkonzentration auch die Pufferkapazität zunimmt.

Deshalb wurde der NaCl -Gradient durch einen Tris -Gradienten ersetzt.

Obwohl damit bei der Ionenaustausch-Chromatographie Ausbeuten von 80% erreicht wurden, fiel auf, daß die Kombination von Chromatographie und AS-Dialyse beim dritten Schritt deutlich schlechtere Ausbeuten ergab, als die gleiche Kombination bei der Molekularsieb-Chromatographie mit Sephadex G-75 superfine.

Dies läßt sich mit Verdünnungseffekten im Verlauf jenes Schrittes erklären, die sich besonders bei den zuletzt eluierten Formen 2A und 2B auswirken; eine andere Erklärungsmöglichkeit wären, trotz Verwendung von Tris - und Cl^- -Ionen nach wie vor vorhandene, im Durchlauf nicht beobachtbare pH-Schwankungen im Mikromilieu, durch die das Enzym nachhaltig geschädigt wird. Das tatsächliche Ausmaß dieser Schädigung zeigt sich erst nach der AS-Dialyse.

Vergleich physikalischer und chemischer Eigenschaften der drei PGK-Formen

Molekulargewicht

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE.

Verglichen wurden:

- von der Maus PGK 1B, 1A, 2B und 2A,
- vom Bullen PGK aus Sperma.

Alle Proteine zeigten eine Bande und liefen gleich weit. Folglich besitzen auch die beiden Formen 2B und 2A aus Mäusesperma das gleiche Molekulargewicht wie die somatischen Formen 1B und 1A aus dem Skelettmuskel der Maus (29): $46\,000 \pm 1\,000$.

pH-Optimum

- Der Standardtestansatz für PGK wurde mit Puffer C hergestellt.
- In diesem Ansatz wurden der jeweilige pH-Wert kurz vor dem Test mit NaOH bzw. HCl konz. am pH-Meter eingestellt und
- 500 μ l zur Aktivitätsmessung in die Küvette pipettiert.
- Die PGK wurde vor Testbeginn standardreaktiviert.
- GAPDH wurde im Testansatz in einer Konzentration von 30 μ M eingesetzt. Dies wurde dadurch erreicht, daß es aus der AS-Suspension acetentrifugiert und entsprechend im Puffer C aufgenommen wurde.
- Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von PGK und GAPDH.

- Nach dem Ablauf der Aktivitätsbestimmung wurde der zugehörige pH-Wert in der Küvette gemessen.

Da die Bestimmung der Aktivität mit dem Indikatorensym GAPDH durchgeführt wurde und das pH-Optimum dieses Enzyms im alkalischen Bereich liegt (15), wurde zum Ausschluß einer limitierenden Wirkung

- bei pH-Werten unter 6,5 mit einem Überschuß von 10 U/ml GAPDH nachgestartet.

Es ergab sich keine Aktivitätsänderung.

Der Aktivitätsverlauf der einzelnen PGK-Formen ist in Abhängigkeit vom pH-Wert in Abb. 7 dargestellt.

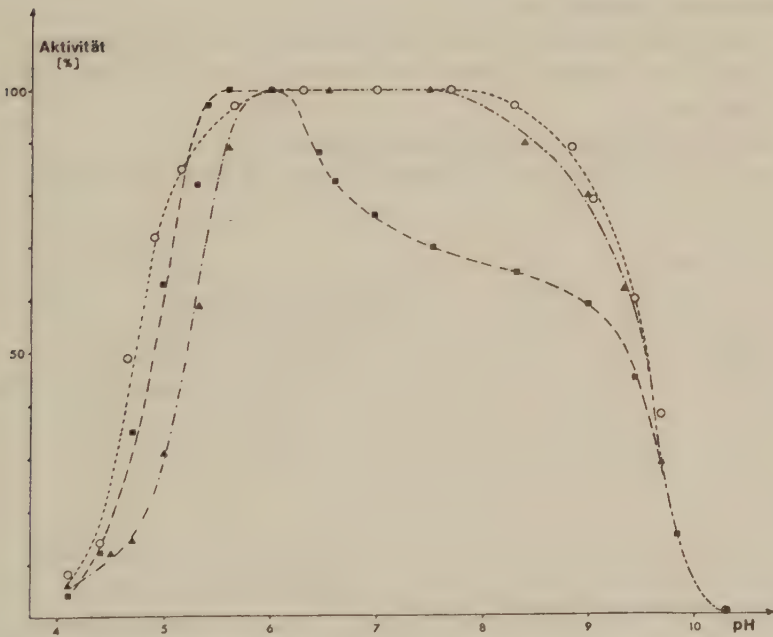


Abb. 7: pH-Optimum mit dem Indikatorensym GAPDH.

-----○-----: 1B; -----■-----: 2B; -----▲-----: 2A;

Ergebnis

Die Auswertung ergab im Vergleich zur somatischen PGK-Form 1B bei der spermaspezifischen Form 2A das gleiche pH-Optimum, bei 2B ein schmäleres, wobei einem 100%-Plateau von pH 5,6 - 6,0 ein langgezogener Aktivitätsabfall folgt. Die Aktivität erreicht an der selben Stelle wie bei den anderen beiden Formen den Wert 0.

pH-Stabilität

Zur Untersuchung der Stabilität in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration wurde die PGK in

- einem Bereich von pH 4,5 - 10,0 , eingestellt mit NaOH bzw. HCl konz.,
- während verschiedener Zeiträume bei 4°C im Puffer C inkubiert. Dann wurde nach
- Standardreaktivering die Restaktivität gemessen.
- Die Aktivität bei pH 7,5 zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde gleich 100% gesetzt.

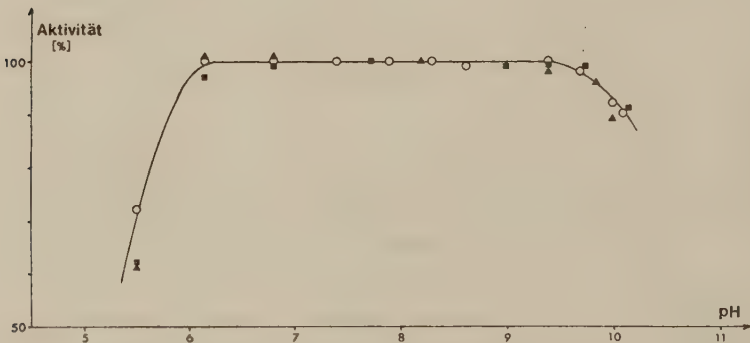


Abb. 8: pH-Stabilität der PGK-Form 1B.

○ : $t = 0h$; ▲ : $t = 6h$; ■ : $t = 24h$;

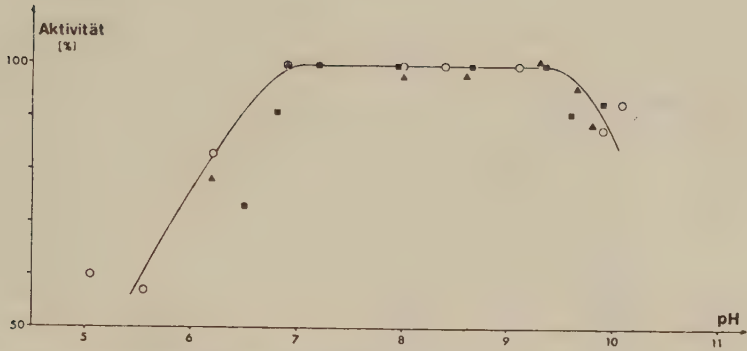


Abb. 9: pH-Stabilität der PGK-Form 2B.

○ : t = 0h; ▲ : t = 6h; ■ : t = 24h;

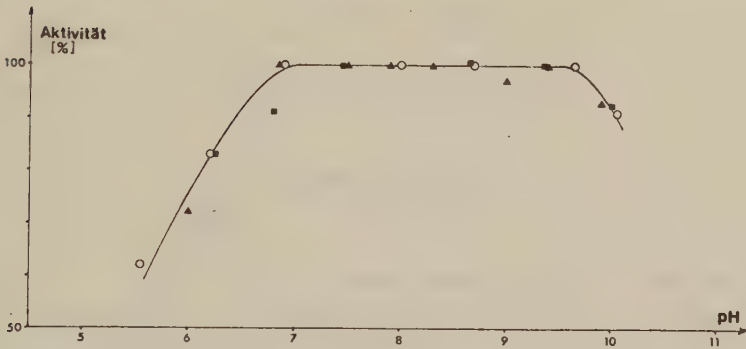


Abb. 10: pH-Stabilität der PGK-Form 2A.

○ : t = 0h; ▲ : t = 6h; ■ : t = 24h;

Ergebnis

Alle drei PGK-Formen zeigten nach t = 0, 6, 24 h und für pH 7 - 9,5 noch optimale Aktivität. 1B war im sauren Bereich stabiler.

Die größten Aktivitätsabnahmen traten zu allen drei Zeiten im Bereich von pH 5,0 - 5,5 in einer Größenordnung von 30 - 40% auf.

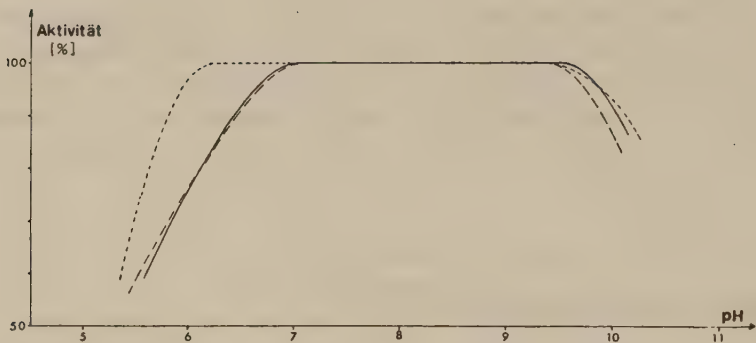


Abb. 11: pH-Stabilität aller drei PGK-Formen im Vergleich.

----- : 1B; ---- : 2B; — : 2A;

Temperatur-Optimum

Die einzelnen PGK-Formen wurden mittels

- Standardreaktivierung stabilisiert und reaktiviert,
- der Standardtestansatz in der Messküvette temperiert und
- die Temperatur vor jedem Test im Photometer gemessen.

Entsprechend dem Arrhenius-Diagramm wurde der Logarithmus der Enzymaktivität gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur aufgetragen (siehe Abb. 12).

Ergebnis

Für alle drei Formen galt:

Ein breites Aktivitäts-Optimum zwischen 312 K und 319 K folgte einem zunächst linearem Anstieg der Aktivität zwischen 290 - 312 K.

Ab 319 K setzte die Inaktivierung ein.

Die Steigung des linearen Anteils war bei allen drei Formen im Rahmen der Messgenauigkeit gleich.

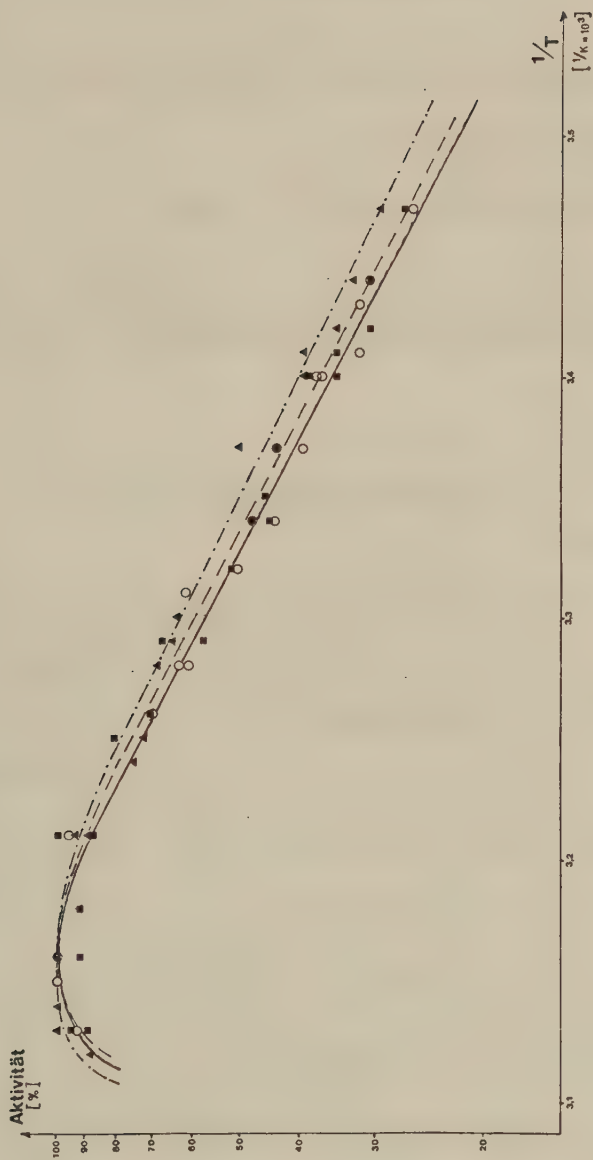


Abb. 12: Temperaturoptimum der PGK-Formen 1B, 2B und 2A.

—○—: 1B; —■—: 2B; —▲—: 2A;

Aktivierungsenergie

Aus der integrierten Form der Arrhenius-Van't Hoffschen - Gleichung:

$$I \quad \ln \frac{k_1}{k_2} = \frac{A}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) ;$$

und der Gleichung einer katalysierten Reaktion 1. Ordnung:

$$II \quad - \frac{dc}{dt} = k c ;$$

läßt sich die Aktivierungsenergie des Enzyms berechnen (17).

Dabei bedeuten:

- $T_i, i = 1, 2;$: Temperatur aus dem linearen Teil des Arrhenius-Diagramms in K (Integrationsgrenzen)
- $R = 8,3144 \text{ J/grad Mol}$: Gaskonstante
- c : Substratkonzentration
- $k_i, i = 1, 2;$: Geschwindigkeits-Konstante der katalysierten Reaktion 1. Ordnung zur Temperatur T_i .
- $E_i, i = 1, 2;$: gemessene Extinktionsänderung für die Temperatur T_i .
- A : Aktivierungsenergie

Aus I folgt:

$$\begin{aligned} \log \frac{k_2}{k_1} &= \frac{A}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \cdot 0,434 ; \\ \Rightarrow A &= \frac{\log \frac{k_2}{k_1} \cdot T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot 0,01916 \text{ kJ/grad Mol} ; \end{aligned}$$

Zur Berechnung kann $\frac{k_2}{k_1} := \frac{E_2}{E_1}$ gesetzt werden.

Die Werte der Aktivierungsenergie der drei PGK-Formen sind in Tab. 9 aufgeführt.

Tab. 9: Aktivierungsenergie der drei PGK-Formen.

PGK-Typ	A (kJ/grad Mol)
1B	37,9
2B	37,0
2A	37,0

Die zur Initiation einer Reaktion nötige Aktivierungsenergie ist also im Rahmen der Messgenauigkeit für alle drei Formen gleich groß.

Michaelis-Menten-Konstanten

Für Reaktionen mit zwei Substraten ist der Wert der Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) für das eine Substrat mit dem einer Einsubstratreaktion vergleichbar, wenn die Konzentration des zweiten Substrats im Sättigungsbereich liegt. Deshalb wurden zur Bestimmung der K_m -Werte von ATP-Mg und 3-PG für das jeweils nicht zu messende Substrat Standardbedingungen (= Substratsättigung) gewählt.

- Alle Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 25°C.
- Die PGK wurde verdünnt, stabilisiert und reaktiviert mit Standardreaktivation.
- Die Extinktionsänderung wurde bei 365 nm als Doppelbestimmung gemessen.

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration wurden die zu messenden Substrate in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

ATP : 0,06 - 0,2 mM; 0,3 - 3,7 mM;

3-PG : 0,2 - 1,0 mM; 1,6 - 12,8 mM;

Diese Konzentrationen wurden enzymatisch mit folgendem Ansatz bestimmt:

Teil I :	Tra-HCl pH 7,5, 22°C	95,0	mM
	MgSO ₄	9,1	mM
	NADH	0,3	mM
	3-PG	15,0	mM (wenn ATP bestimmt wurde)
	ATP	3,4	mM (wenn 3-PG bestimmt wurde)
	GAPDH	10,0	U/ml

Start mit:

Teil II: PGK aus Hefe 40,0 U/ml

Zur K_m -Bestimmung in der Rückreaktion erfolgten die Messungen mit Teil I des eben genannten Ansatzes, jedoch betrug hier die Konzentration der

PGK-1B, -2B und -2A: 0,01 - 0,02 U/ml;

Ergebnis

Die Werte für die Form 1B waren unabhängig davon, ob das Enzym aus Skelettmuskel oder aus Hodengewebe isoliert wurde. Bei höheren ATP- bzw. 3-PG-Konzentrationen war der Lineweaver-Burk-Plot für die Form 1B nicht mehr linear, sodaß aus den höheren und niedrigeren Konzentrationen eindeutig zwei K_m -Werte extrapoliert werden konnten (siehe Seite 45, Tab. 10).

Für die spermienspezifischen Formen ergab sich jeweils nur ein K_m -Wert in allen Konzentrationsbereichen.

Zwischen den jeweiligen K_m -Werten bestehen folgende Beziehungen:

Die K_m -ATP-Mg-Werte von 2B und 2A entsprechen demjenigen von 1B für das zweite Intervall (siehe Seite 43 unten: Konzentrationsbereiche für ATP und 3-PG).

Der K_m -3-PG-Wert von 2B entspricht etwa dem von 1B für das erste Intervall, der von 2A dem von 1B für das zweite.

Tab. 10: Michaelis-Menten-Konstanten für die PGK-Formen 1B, 2B und 2A und Vergleich mit Werten aus der Literatur.

PGK-Typ	K_m -ATP-Mg (mM)*	K_m -3-PG (mM)*
1B	0,49 (0,70)	0,75 (2,09)
2B	0,81	0,85
2A	0,91	2,25
(Mühlbacher, 1980) :		
1B	0,42 (0,96)	0,78 (2,10)
1A	0,43 (0,80)	0,65 (2,20)
(Krietsch, 1970):		
Kaninchenmuskel	0,42	0,42 (1,37)

* : Die K_m -Werte für das zweite, höhere Konzentrationsintervall sind in Klammern angegeben; siehe dazu Seite 43 unten.

Vergleich mit anderen Ergebnissen

Tab. 11: Vergleich der Eigenschaften der drei PGK-Formen mit Werten von Pegoraro und Lee (30,25), soweit möglich.

	Pegoraro und Lee (1978)				U/mg
	1B	2B	2A	Muskel (1B) 2A	
Spez. Akt.	710	410	410	500 260 - 450	
K_m ATP-Mg	0,49 (0,70)	0,80	0,91 (25°C)	DBA/2J: 0,22 (27°C) 0,26 (37°C) C57BL/6J: 0,21 (27°C) 0,21 (37°C)	0,35 (27°C) 0,32 (37°C) 0,30 (27°C) 0,32 (37°C)
K_m 3-PG	0,75 (2,09)	0,85	2,25 (25°C)	DBA/2J: 0,96 (27°C) 1,77 (37°C) C57BL/6J: 0,71 (27°C) 1,16 (37°C)	1,17 (27°C) 1,68 (37°C) 1,05 (37°C) 1,41 (37°C)
Molekulargewicht	identisch: 46 000 ± 1 000			45 000 ± 3 000 bzw 47 000 ± 2 000	MG
pH-Optimum	5,7-8,1	5,6-6,0	6-8	identisches Maximum bei 6,5 und leichte Aktivitätsabnahme bis 9,0	pH-Einzel.
pH-Stabilität	stabil von 7,0 - 9,5 (24h)			stabil bei 9,6 für 30 min und Restakt. von 70% bei 4,7 nach 45 min	
Temperaturoptimum	identisch: 312-319 K (entspricht: 39-46 °C bei pH 7,6)			identisch: leichter Aktivitätsanstieg von 25 - 40 °C bei pH 8,0	

*: Werte aus (25), ähnliche Werte in (26). Die Angaben beziehen sich auf die verschiedenen Coenzym- und Substratkonzentrationen: ohne Klammern 0,1 - 10 mM; mit Klammern 2,5 - 10 mM.

Allele Isoenzyme in verschiedenen Mäusestämmen

In Tab. 12 ist eine Liste verschiedener Mäusestämmen mit ihren jeweiligen spermien-spezifischen PGK-Isoenzymen angegeben. Die meisten Angaben sind der Literatur entnommen (27,38).

Tab. 12: Spermien-spezifische, allele Isoenzyme in verschiedenen Mäusestämmen.

Stamm	PGK-Isoenzyme	Stamm	PGK-Isoenzyme
101*	2A	C57BL/10Sn	2A
129/Sv	2C	C57BL/Ka	2A
A/HeJ	2A	C57BR/cdJ	2A
A/J*	2A	C57L/J	2C
AKR/J	2B	CBA*	2B
AU/SsJ	2A	CBA/J	2B
BALB/c*	2A	DBA/1J	2A
BALB/cAn	2A	DBA/2J	2A
BALB/cByJ	2A	LG/J	2B
BALB/cJ	2A	NMRI*	2A 2B
BDP/J	2A	NZW	2A
BUB/BnJ	2A	MA/MyJ	2B
C3H	2B	P/J	2A
C3Hx101*	2A 2B	PL/J	2A
C3H/HeHa*	2B	RF/J	2B
C3H/HeJ	2B	SEC/1ReJ	2A
C3H/HeSn	2B	SJL/J	2A
C3HeB/FeJ	2B	SM/J	2A
C57BL/6By	2A	ST/bJ	2B
C57BL/6J*	2A	SWR/J	2A
C57BL/10J	2A		

*: Diese Stämme wurden von uns elektrophoretisch getestet.

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Tab. 13: Vergleich der PGK-Formen 1B, 2B und 2A.

	1B	2B	2A	
SDS-PAGE	1	1	1	Bande
Spez. Akt.	710 (- 1000)	410	410	U/mg
Anreicherungsfaktor	920	530	530	
Verteilung im Rohextrakt bei:				
C3H/101	32	35	32	%*
101	37	-	63	%*
nach IT	48	25	27	%*
Ablösung auf IT bei	20 (läuft durch)	35	44	mM Tris
K _m -ATP-Mg	0,49 (0,70)	0,81	0,91	mM**
K _m -3-PG	0,75 (2,09)	0,85	2,25	mM**
pH-Optimum	5,7 - 8,1	5,6 - 6,0	6 - 8	pH-
pH-Stabilität (24 h)	identisch : 7,0 - 9,5			Einheiten
Molekulargewicht	identisch : 46 000 ± 1 000			MG
T - Optimum	Identisch : 312 - 319			K
Aktivierungsenergie	37,9	37,0	37,0	kJ/grad Mol

* = 100% Gesamtaktivität aller drei bzw zwei Formen.

** = K_m-Werte in Klammern stehen für das zweite, höhere Konzentrationsintervall
(siehe Seite 43 unten).

Tab. 14: Vergleich der PGK-Isolierung aus Hoden und Skelettmuskel der Maus.

	Hoden			Skelettmuskel			
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	
Rohextrakt:							
Aktivität bzgl. Gewebegewicht	22	70	12	14	270	37	U/g Frischgew.
Spez. Akt.	3	2,3	0,3	3	6,7	0,5	U/mg Protein
Fremdprotein		1/220			1/100		PGK/Protein ges.
nach ATP-Sephrose:							
Spez. Akt.	3	60	25	4	320		U/mg Protein
Ausbeuten nach:							
Chromatographie	22	84	12	4	75	10	%
Chromatogr.+AS	6	82	11				%
Fremdprotein		1/8			1/2		PGK/Protein ges.
nach Sephadex G-75 superfine:							
Spez. Akt.	9	280	60	3	640	130	U/mg Protein
Ausbeute nach:							
Chromatographie	9	79	15	3	76	12	%
Chromatogr.+AS	5	79	6	3	91	6	%
nach DEAE-Sephrose CL-6B:							
Spez. Akt. (1B,2B,2A)	8	510	70				U/mg Protein
Ausbeute nach:							
Chromatographie	8	80	11				%
Chromatogr.+AS	8	62	17				%

D i s k u s s i o n

Isolierung der PGK

Die Isolierung der Mäuse-PGK-2 ist zwar bereits versucht worden, aber bisher noch nicht mit befriedigenden Ergebnissen gelungen (31); dagegen konnte das Enzym aus Widdersperma isoliert werden (35). Ausgehend von einem 2-Schritt-Isolierungsverfahren für PGK-1 aus Skelettmuskel (29) wurden aus Mäusehoden und -nebenhoden die spermienspezifischen PGK-Formen 2A und 2B isoliert. Dazu wurden Mäuse von den Stämmen C3H x 101 und NMRI, die im somatischen Hodengewebe die PGK-1B und in den Spermien die Formen 2A und 2B exprimieren, verwendet. Das Verfahren zur Isolierung von PGK-1 konnte nicht ohne weiteres übernommen werden, da das Enzym im gewonnenen Rohextrakt sehr instabil war und die drei PGK-Formen voneinander getrennt werden mußten.

Im Vergleich zum Ausgangsverfahren wurden folgende Modifikationen durchgeführt:

Die präparierten Organe wurden direkt im tiefgefrorenen Zustand mit einem Mixer homogenisiert und der gewonnene Rohextrakt zentrifugiert. Das Zentrifugat mußte sorgfältig von allen Lipidanteilen befreit werden.

Bei der anschließenden Affinitäts-Chromatographie mit ATP-Sepharose wurde bezogen auf die Bindungskapazität der ATP-Sepharose (23), das 4fache Gelvolumen eingesetzt, um noch im Rohextrakt verbliebene Lipidreste abzutrennen. Außerdem wurde zu Rohextrakt und Puls 0,2 mM DTE hinzugefügt, um die Aktivität zu erhalten, und um höhere Proteinkonzentrationen zu erreichen wurde einerseits die Molarität des Pulses erhöht und andererseits die eluierte PGK-Fraktion in AS ausgefällt.

Im nächsten Schritt, der Molekularsieb-Chromatographie mit Sephadex G-75 superfine, wurde die Enzymkonzentration der aufgetragenen Probe um das 3- bis 4fache erhöht (1 200 - 1 500 U/ml) und der eluierte PGK-Pool ebenfalls in AS ausgefällt.

Obwohl im Vergleich zu Muskelpräparationen ein wesentlich höherer Fremdproteinanteil im Rohextrakt gegeben war (PGK-Muskel/Protein gesamt = 1/100; PGK-Hoden/Protein gesamt = 1/220), zeigte die SDS-PAGE nach Sephadex G-75 superfine ebenfalls nur eine dem Molekulargewicht der PGK-1 entsprechende Bande.

Mit einem für die weitere Präparation nicht geeigneten Verfahren zur Gewinnung des Rohextraktes ließ sich die gewebespezifische Aktivität um 30% steigern. Somit konnte gezeigt werden, daß die in dieser Isolierung angegebene gewebespezifische Aktivität nicht den in vivo vorliegenden Konzentrationen entspricht.

Die so gewonnene Probe enthielt also ein Gemisch der drei PGK-Formen 1B, 2B und 2A und eventuell noch ein Fremdprotein des gleichen Molekulargewichts. Dies konnte durch eine Cellogel-Elektrophorese mit Coomassie-Brillantblau-Anfärbung mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Um die drei Formen voneinander zu trennen, wurde eine Ionenaustausch-Chromatographie mit DEAE-Sephadex CL-6B durchgeführt.

Dies bereitete einige Schwierigkeiten, da sich mit dem üblichen NaCl-Gradienten keine reproduzierbare, formenspezifische Trennung mit ausreichender Ausbeute erzielen ließ. Erst nachdem in einigen Vorversuchsreihen die Ursache dafür gefunden worden war, ließen sich alle drei Formen mit einem Tris-Gradienten befriedigend trennen.

Damit war es gelungen, mit einem 3-Schrittverfahren (Affinitäts-, Molekularsieb-, Ionenaustausch-Chromatographie) die PGK-Formen 1B, 2B und 2A aus Mäusehoden und -nebenhoden einzeln zu isolieren und dabei um die Faktoren 920, 530 und 530 anzureichern.

Physikalische und chemische Eigenschaften

Vergleicht man die Eigenschaften der mit dem angegebenen Isolierungsverfahren gewonnenen PGK-Formen, so zeigt sich, daß alle drei bezüglich Molekulargewicht, Temperaturoptimum, Aktivierungsenergie und pH-Stabilität im Rahmen der Meßgenauigkeit mit den für 1B und 1A aus Mäuseskelettmuskel bekannten Werten (29) übereinstimmen (siehe Seite 48, Tab. 13).

Bemerkenswert ist, daß die drei bekannten PGK-2-Formen bei 45°C eine verminderte Stabilität im Vergleich zu PGK-1 aufweisen (26). Da der Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit von der Temperatur bei den drei untersuchten Formen gleich ist, nämlich gleicher linearer Anstieg im Bereich der Körpertemperatur der Maus (36-38°C) und maximale Aktivität zwischen 39 und 46°C, kann im letztgenannten Bereich ein Aktivitätsverlust der PGK in den Spermien auftreten. Zusammen mit einer Arbeit über PGK-2C (40) - diese Form weist eine extrem verminderte spezifische Aktivität auf und Mäuse, die diese Form exprimieren, zeigen eine verminderte Fertilität - ergibt sich ein Erklärungsmodell für die Fertilitätsstörungen bei Kryptorchismus:

Die erhöhte Temperatur im nicht deszendierten Hoden führt zu einer Inaktivierung von Glykolyseenzymen und damit zur Verminderung der Energiereserven der Spermien.

Unterschiede ergaben sich einerseits in der spezifischen Aktivität, wobei die X-chromosomal kodierten und die autosomal kodierten Formen verschiedene, untereinander aber gleiche Werte zeigten, und andererseits in den Werten für das pH-Optimum. In dieser Eigenschaft gleichen sich 1B und 2A, während 2B nur in einem schmalen Ausschnitt am sauren Ende des gleichen Bereiches optimale Aktivität zeigte. In den Michaelis-Menten-Konstanten unterschieden sich die autosomal kodierten Formen sowohl von den X-chromosomal kodierten als auch untereinander. Die Formen 2A und 2B zeigten nicht in Abhängigkeit von den Substratkonzentrationen zwei unterschiedliche Werte wie die Formen 1B und 1A. Sie besitzen für K_m -ATP-Mg den Wert der X-chromosomal kodierten Formen für höhere Substratkonzentrationen, dagegen ist der Wert für K_m -3-PG von 2B mit dem Wert von 1B/1A für niedrigere Substratkonzentrationen, der von 2A mit dem für höhere identisch. Außerdem unterscheiden sie sich in ihren Isoelektrischen Punkten, wie das Verhalten in der Ionenaustausch-Chromatographie zeigte.

Vergleich mit anderen Ergebnissen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, hatten Pegoraro und Lee 1978 ein Verfahren zur getrennten Isolierung von 1B und 2A aus Hoden der Mäuse-

stämmen C57BL/6J und DBA/2J angegeben. Dabei handelte es sich um ein 4-Schrittverfahren, bestehend aus einer

Affinitäts-Chromatographie (anderes Gel, anderer Puffer) - dieser Schritt mußte wegen der schlechten Bindungseigenschaften des Gels für PGK mit Durchlauf und Eluat der Pufferwaschung wiederholt werden - einer

Ionenaustausch-Chromatographie (anderer Austauscher, Puffer und pH), die 1B und 2A voneinander trennte und einer

Molekularsieb-Chromatographie (anderes Gel, anderer Puffer) zur Reinigung von knapp der Hälfte des 2A-Eluates von einem noch vorhandenen hochmolekularen Protein.

Ein Vergleich zwischen dem Isolierungsverfahren von Pegoraro und Lee und dem hier vorgestellten findet sich in Tab. 15.

Tab. 15: Gegenüberstellung der Arbeit von Pegoraro und Lee (31) mit der hier vorgestellten.

Pegoraro und Lee			Werte dieser Arbeit		
Enzym aus	Gesamtakt. (U/g Gew)	Spez. Akt. (U/mg Pro)	Gesamtakt. (U/g Gew)	Spez. Akt. (U/mg Pro)	
Rohextrakt	Hoden	19	0,43	70	2,3
	Muskel	60	3,0	270	6,1 - 7,2
Affinitäts- chromgr.	Hoden	15	35	57,5	60
	Muskel	48	80	220	320 - 335
Ionenaus- tauscher	Hoden	4,8*	260 - 450	12,7	410
	Muskel	40	500	176**	710 - 1 000**

* : entspricht 25% Ausbeute bzgl. Rohextrakt von Pegoraro/Lee, aber 6,8% bzgl. 70 U/g Gewebe

** : nach Sephadex G-75 superfine

In diesem Vergleich fällt auf, daß bereits im Rohextrakt nur sehr geringe Enzymkonzentrationen vorlagen (4 U/ml) und die gesamte Isolierung ebenfalls

mit sehr geringen Enzymaktivitäten durchgeführt wurde (nach der Affinitäts-Chromatographie: $7,5 \text{ U/ml}$, nach der Ionenaustausch-Chromatographie: 2 U/ml , vor der Molekularsieb-Chromatographie: 62 U/ml). Nach unseren Erfahrungen war das Enzym in diesen Konzentrationen sehr instabil. Offenbar hat jedoch die Verwendung verschiedener Puffersysteme im Verlauf der einzelnen Präparationschritte zu besseren Ausbeuten geführt, wenn die Endergebnisse auf die Aktivität des jeweiligen Rohextraktes bezogen wurden (Pegoraro und Lee: 25%, hier: 18%). Dennoch konnte mit unserem kürzeren Verfahren die 2,7fache Ausbeute bezogen auf das Hodenfrischgewicht erzielt werden. Da in der Arbeit von Lee und Pegoraro keine Angaben zum 2A-Gehalt im Rohextrakt gemacht wurden und wir keine Mäuse der Stämme C57BL/6J bzw. DBA/2J zur Verfügung hatten, wurden die Werte für die Aktivität zur Berechnung der Ausbeuten auf das Rohgewicht des Hodengewebes bezogen.

Leider haben Pegoraro und Lee keine Reinheitskriterien angegeben.

Soweit bei Lee et al. vergleichbare Aussagen - meist sind die Voraussetzungen schwächer - zu Temperatur-Optimum und Molekulargewicht gemacht wurden, haben wir sie bestätigen können. Die Angaben zu pH-Stabilität, pH-Optimum und den Michaelis-Menten-Konstanten haben sich nicht bestätigen lassen (pH-Optimum: bei pH 6,5 mit Aktivitätsabnahme bis pH 9,0; dieses Aktivitätsverhalten ergab sich bei uns nur für die Form 2B; zu den K_m -Werten fanden sich in verschiedenen Arbeiten (30,25,26) der gleichen Autoren unterschiedliche Werte).

Ausblick

Da es also gelungen war, spermienspezifische PGK zu isolieren, ergibt sich die Möglichkeit, eine Reihe von Fragenkomplexen zu bearbeiten.

So wurden bereits weibliche und männliche C3H/Aa- und NMRI-Mäuse mit PGK-2A bzw. PGK-2A/2B immunisiert, geboostert und zum Zeitpunkt hoher Antikörpertiter verpaart (14). Dabei konnten die Ergebnisse im Hinblick auf eine Reduktion der Fertilität, wie sie teilweise in Versuchen mit LDH-C4 erzielt wurden (12,43), nicht bestätigt werden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich Wurfgröße und Geschlechterverteilung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe, sodaß sich unter diesen Bedingungen keine Reduktion der Fertilität in vivo nachweisen ließ.

Darüber hinaus sollen spezifische monoklonale Anti-PGK-2-Antikörper erzeugt und diese fluoreszenzmarkiert werden, um mit ihrer Hilfe die PGK-2 in der Zelle, insbesondere in den Spermien nachzuweisen und zu lokalisieren. Außerdem ist es möglich, den Einfluß dieser Antikörper auf die Motilität der Spermien zu untersuchen. Ein derartiger Einfluß wäre etwa dann denkbar, wenn ein Mechanismus nachweisbar wäre, durch den eine Anlagerung von PGK-2 an die Oberfläche von Spermien mit anschließender Antigen-Antikörperbindung mit Anti-PGK-2-AK zu deren Immobilisierung führt.

Anti-PGK-2-Antikörper können dazu verwendet werden, immunfluoreszenzoptisch an histologischen Schnitten nachzuweisen, wann während der Spermiogenese in den Keimbahnzellen und wann, falls erforderlich, während der foetalen Stadien das PGK-2-Isoenzym synthetisiert wird. Außerdem können befruchtete Eier und frühe Embryonalstadien im Hinblick auf PGK-2-Aktivität analysiert werden, um zu bestimmen, wann die Produktion der väterlichen PGK-2 eingestellt wird. In diesem Zusammenhang ist die zeitliche Regulation und Expression von väterlicher PGK-1 von Interesse.

Zusammenfassung

Aus einem Isolierungsverfahren für PGK-1 aus Skelettmuskel wurde ein 3-Schritt-Verfahren entwickelt, um die spermienspezifischen PGK-Formen 2A und 2B getrennt aus Mäusehoden und -nebenhoden isolieren zu können. Die Reinheit der Enzyme wurde mittels SDS-PAGE und Cellogel-Elektrophorese getestet.

Abgesehen von geringen Schwankungen blieb das Verteilungsmuster der drei Formen im Verlauf der Präparation gleich. Die Ausbeute über die gesamte Präparation lag durchschnittlich bei 35%, was bezogen auf das Hodenfrischgewicht eine Steigerung um das 2,7fache im Vergleich zu bisher bekannten Verfahren bedeutet. Damit gelang es, reine PGK-2 in ausreichender Menge zu erhalten, um weitere Versuche durchzuführen.

Ein Vergleich der Eigenschaften von somatischer und spermienspezifischer PGK ergab bezüglich Molekulargewicht, Temperatur-Optimum, Aktivierungsenergie und pH-Stabilität keine Unterschiede. Dagegen zeigten die Formen 2A und 2B nur etwa 60% der spezifischen Aktivität von PGK-1, hatte die Form 2B ein schmäleres pH-Optimum als alle übrigen und ergab sich für die Michaelis-Menten-Konstanten für PGK-2B und PGK-2A jeweils nur einer der beiden Werte von 1B; auch die isoelektrischen Punkte sind verschieden.

Materialien

Chemikalien

Glycin, Glycerin, Zitronensäure, Äthylendiamintetraacetat, Magnesiumsulfat, Natriumhydroxid, Ammoniumsulfat, Triäthanolamin, Kaliumhydrogenphosphat, Glukose, Ammoniumacetat, Histidin, 1,4-Dithioerythrit, Natriumcitrat, Diäthylbarbitursäure-Na-Salz, Kaliumcyanid, Thymol (krist.), Harnstoff, Adenosin-5'-triphosphorsäure: Merk AG, Darmstadt.

Rinderserumalbumin, Mercaptoäthanol, N,N,N',N' -Tetramethyläthylendiamin, Imidazol, Polyäthylenglykol (Typ 40 000), Dodecyl-Na-Salz, N,N' -Methylenbisacrylamid, Acrylamid: Serva GmbH, Heidelberg.

Adenosin-5' -diphosphorsäure, Glycerinaldehyd-3-phosphat, Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (oxid.), Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxid. und reduz.), Fruktose-1-6-diphosphat, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Aldolase, Glukose-6-phosphatdehydrogenase, alpha-Glycerophosphatdehydrogenase: Boehringer GmbH, Mannheim.

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan: Roth KG, Karlsruhe.

Sephadex G-75 superfine, DEAE-Sepharose CL-6B: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.

Celluloseacetatgelfolien der Stärke 500 µm, Celluloseacetatpapier: Celtec Diagnostic GmbH, Oberursel.

Tiere

Mäuse vom Stamm C3H x 101: Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg.
C3H: Eigene Zucht.
NMRI: Firma Hormonchemie, München und
Firma Klinge, München.
Eigene Zucht.

Geräte

Mikrophorkammer für Celluloseacetat-Elektrophorese:

Boskamp Gerätebau KG, Oberursel.

Registrierendes Photometer:

Netheler und Hinz, Hamburg.

Kompensationsschreiber:

Servogor.

Spektralphotometer DK-2A, Ultrazentrifuge L2-65K:

Beckman Instruments.

Ultrazentrifuge RC2-B:

Sorvall.

Fraktionssammler:

LBK.

Abkürzungen

Enzyme

Abkürzung	Enzym	E C Nummer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase	1.2.1.12
LDH-C4	Lactatdehydrogenase (spermienspezifisch)	1.1.1.27
PGK	Phosphoglyceratkinase	2.7.2.3
elektrophoretische Varianten:		
PGK A	somatische, X-chromosomal kodierte bei Säugern	
PGK B	spermienspezifische, autosomal kodierte bei Säugern	
PGK 1A	somatische, X-chromosomal kodierte Mutantenform bei der Maus	
PGK 1B	somatische, X-chromosomal kodierte Wildtypform bei der Maus	
PGK 2A	spermienspezifische, autosomal kodierte, schnelle Variante bei der Maus	
PGK 2B	spermienspezifische, autosomal kodierte, langsame Variante bei der Maus	
PGK 2C	spermienspezifische, autosomal kodierte, sehr schnelle Variante bei der Maus	

Substrate und Reagentien

3-PG	3-Phosphoglycerat
ATP	Adenosintri-phosphat
DTE	1,4-Dithioerythrit
NADH	Nicotinamidadeninidinucleotid, red.

Sonstige Abkürzungen

AK	Antikörper
Akt.	Aktivität
AS	Amoniumsulfat
ATP-Puls	spezifischer Elutionspuls auf ATP-Sepharose
ATP-Sepharose	ATP-ribosyl-adipoyl-dihydrazo-Sepharose
Elpho	Elektrophorese
G-75	Sephadex G-75 superfine zur Molekularsieb-Chromatographie
Gesamtakt.	Gesamtaktivität
Gew.	Gewicht
Gewebespez. Akt.	Gewebespezifische Aktivität
IT	Ionenaustausch-Chromatographie
IT-Nr	Nummer einer Ionenaustausch-Chromatographie
Km	Michaelis-Menten-Konstante
MG	Molekulargewicht
n	Anzahl der Versuche
s	Standardabweichung
SDS	Dodecylsulfat-Na-Salz
SDS-PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter Zusatz von SDS zu Laufgel, Laufpuffer und Probenpuffer
Spez. Akt.	Spezifische Aktivität des Enzyms
Tra-HCl	Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffersubstanz
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
V	Volumen
$\bar{x}$	Mittelwert

L i t e r a t u r

1. Beisenherz G., Boltze H.J., Bücher Th., Czok R., Garbade K.H., Meyer-Arendt E. und Pfeleiderer G. (1953)
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. f. Naturf. 8b, 555 - 576.
2. Brooks D.E. (1976)
Activity and Androgenic Control of Glycolytic Enzymes in the Epididymidis and Epididymal Spermatozoa of the Rat.
Biochem. J. 156, 527 - 537.
3. Bücher Th. (1947)
Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment.
Biochim. Biophys. Acta 1, 292 - 314.
4. Bücher Th., Bender W., Fundele R., Hofner H. und Linke I. (1980)
Qualitative Evaluation of Elektrophoretic Allo- and Isozyme Patterns.
FEBS LETTERS 115, No.2, 319 - 323.
5. Chen S.H., Yoshida A. und Giblett E.R. (1970)
Polymorphism of Phosphoglycerate Kinase (PGK): An X-Linked Locus in Man.
Amer. J. Hum. Genet. 22, 41.
6. Chen S.H., Malcolm A.L., Yoshida A. et al. (1971)
Phosphoglycerate Kinase: An X-Linked Polymorphism in Man.
Am. J. Hum. Genet., 23, 87 - 91.
7. Cooper D.W., VandeBerg J.L., Sharman G.B. und Boole W.E. (1971)
Phosphoglycerate Kinase Polymorphism in Kangaroos provides Further Evidence for Paternal X-Inactivation.
Nature New Biology 230, 155.

8. Elcher E.M., Cherry M. und Flaherty L. (1978)
Autosomal Phosphoglycerate Kinase linked to Mouse Major Histokompatibilität Complex.
Molec. gen. Genet. 158, 225 - 228.
9. Erickson R.P., Hoppe P.C., Tennebaum D., Spielmann H. und Epstein C.J. (1975)
Lactate Dehydrogenase X: Effects of Antibody on Mouse Gametes but Not on Early Development.
Science 188, 261.
10. Erickson R.P., Friend D.S. und Tennebaum D. (1975)
Localisation of Lactate Dehydrogenase-X of the Surfaces of Mouse Spermatozoa.
Exp. Cell. Res. 91, 1 - 5.
11. Erickson R. P. (1976)
Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity changes during Spermatogenesis: Possible Relevance to X-Chromosom Inactivation.
Dev. Biol. 53, 134.
12. Goldberg E. und Lerum J. (1972)
Pregnancy Suppression by an Antiserum to the Spermspecific Lactate Dehydrogenase.
Science 176, 686 - 687.
13. Goldberg E. (1973)
Infertility in Female Rabbits Immunized with Lactate Dehydrogenase X.
Science 181/II, 458 - 459.
14. Haedenkamp G.A., Obermaier A.W., Krietsch W.K.G. (1983)
Fertility of Mice Immunized with Spermspecific Phosphoglycerate Kinase (PGK-2).
(wird veröffentlicht)

15. Johnson L.N. und Waley S.G. (1967)
Preliminary Crystallographic Data for Triose Phosphate Isomerase.
J. Mol. Biol. 29, 321.
16. Kaiser R. und Schumacher G.F.B. (1981)
Menschliche Fortpflanzung.
Thieme Verlag, 268 - 270.
17. Koblet H. (1971)
Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie (Abschnitt: Die Aktivierung).
Thieme Verlag, 135 - 141.
18. Kozak L.P., Mc Lean G.K. und Eicher E.M. (1974)
X-linkage of Phosphoglycerate Kinase in the Mouse.
Biochem. Gen. 11, 41 - 47.
19. Kozak L.P. (1975)
Evidence for Dosage Compensation of an X-Linked Gene in the 6-Day Embryo of the Mouse.
Dev. Biol. 45, 65 - 73.
20. Kramer J.M. (1981)
Immunofluorescent Localisation of PGK-1 and PGK-2 Isozymes within Specific Cells of the Mouse Testis.
Dev. Biol. 87, 30 - 36.
21. Krietsch W.K.G., Bücher Th. (1970)
3-Phosphoglycerate Kinase from Rabbit Skeletal Muscle and Yeast.
Eur. J. Biochem. 17, 586 - 580.
22. Krietsch W.K.G. (1970)
Kristallisation und Charakterisierung der Phosphoglyceratkinase aus Kaninchenskelettmuskel und Vergleich mit dem Enzym aus der Hefe.
Dissertation an der Nat. Fakultät der LMU.

23. Kuntz G.W.K., Eber St., Kessler W., Krietsch H. und Krietsch W.K.G.
(1978)
Isolation of Phosphoglycerate Kinases by Affinity Chromatographie.
Eur. J. Biochem. 85, 493 - 501.

24. Laemmli U.K. (1970)
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of
Bacteriophage T4.
Nature 227, 680.

25. Landsteiner K. (1899)
Zur Kenntnis der spezifisch auf Blutkörperchen wirkenden sera.
Zentralbl Bakteriol 25, 546.

26. Lee Ch.-Y. und Pegoraro B. (1979)
Biochemical and Immunological Studies of Three Genetic Variants
of 3-phosphoglycerate Kinase 2 from the Mouse.
Biochem. Gen. 17 Nos 7/8, 631 - 644.

27. Lee Ch.-Y., Niesel D., Pegoraro B. und Erickson P. (1980)
Immunological and Structural Relatedness of Isozymes on Genetic Vari-
ants of 3-Phosphoglycerate Kinase from the Mouse.
J. Biol. Chem. 255, No.6, 2590 - 2595.

28. Mühlbacher Ch. (1980)
Isolierung und Charakterisierung der somatischen Phosphoglyceratkinase
aus Mäuseskelettmuskel und Vergleich zweier alleler Isoenzyme.
Diplomarbeit.

29. Mühlbacher Ch., Kuntz G.W.K., Haedenkamp G.A., Krietsch W.K.G.
(1983)
Comparison of the Two Purified Allozymes (1B and 1A) of X-linked
Phosphoglycerate Kinase in the Mouse.
Biochem. Gen. 21, Nos.5/6, 487 - 496.

30. Nielson J.T. und Chapman V.M. (1977)
Electrophoretic Variation of X-linked Phosphoglycerate Kinase (PGK-1) in the Mouse.
Genetics 87, 319 - 325.
31. Pegoraro B. und Lee Ch.-Y. (1978)
Purification and Characterisation of Two Isozymes of PGK from the Mouse.
Biochim. Biophys. Acta 522, 423 - 433.
32. Petzoldt D. (1972)
Fertilitätsstörungen des Mannes.
Sonderdruck aus: Der Hautarzt Mskr. 953, 1-2.
33. Rudolph N.S. und VandeBerg J.L. (1980)
Restriction of PGK-B to Spermatogenic Cells: Evidence from Experimentally Cryptorchid Mice.
Dev. Genet. 1, 341 - 353.
34. Salisbury G.W., Hart R.G. und Lodge J.R. (1977)
The Spermatozoon.
Perspec. Biol. Med. Spring: 372 - 393.
35. Stewart A.A., Scopes R.K. (1978)
Phosphoglycerate Kinase B from Ram Testis.
Eur. J. Biochem. 85, 89 - 95.
36. Stock M.R. (1980)
Untersuchungen zum Vorkommen von Spermatozoen-Antikörpern im Serum nach Vasektomie.
Dissertation an der Med. Fak. der LMU.
37. Valentine W.H., Hsieh H.S., Paglia D.F. et al. (1969)
Hereditary Hemolytic Anemia associated with Phosphoglycerate Kinase Deficiency in Erythrocytes and Leucocytes.
New Engl. J. Med. 280, 528.

38. VandeBerg J.L., Cooper D.W. und Close P.J. (1973)
Mammalian Testis Phosphoglycerate Kinase.
Nature New Biology 243, 48 - 50.
39. VandeBerg J.L., Cooper D.W. und Close P.J. (1976)
Testis Specific Phosphoglycerate Kinase B in Mouse.
J. Exp. Zool. 198, 231 - 240.
40. VandeBerg J.L. und Blohm S.V. (1977)
An Allelic Isozyme of Mouse PGK-2 with low Activity (Rapid Communication).
J. Exp. Zool. 201, 479.
41. VandeBerg J.L. und Klein J. (1978)
Localisation of Mouse PGK-2 at the D-End of the H-2 Complex.
J. Exp. Zool. 203, 319 - 324.
42. VandeBerg J.L., Lee Ch.-Y. und Goldberg E. (1981)
Immunohistochemical Localisation of Phosphoglycerate Kinase Isozymes in Mouse Testes.
J. Exp. Zool. 217, 435 - 441.
43. Wellerson R., Wagstaff P., Asculai S., Hudson M. und Kupferberg A.B. (1974)
Induction of Aspermatogenesis in Guinea Pig through Immunisation with Lactate Dehydrogenase-X Isozyme.
Int. J. Fert. 19, 65 - 72.
44. Wheat Th.E., Hintz M., Goldberg E. und Margoliash E. (1977)
Analyses of Stage-Specific Multiple Forms of Lactate Dehydrogenase and of Cytochrome c during Spermatogenesis in the Mouse.
Differentiation 9, 37 - 41.

Lebenslauf

Am 22.8.1949 wurde ich als erster Sohn des Mechanikermeisters Albert Obermaier und seiner Ehefrau Ludmilla, geb. Steinhuber, in Stubenberg/Rot-tal-Inn geboren. Ich habe noch einen jüngeren Bruder. Mein Vater starb 1972. Im September 1979 wurde mein Sohn Anselm Gregor Kusser geboren.

1969 legte ich das Abitur am Tassilo-Gymnasium in Simbach/Inn ab. Nachdem ich meinen Zivilen Ersatzdienst abgeleistet hatte, schrieb ich mich 1971 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München für das Studium der Mathematik ein. Während ich 1976 an der Diplomarbeit in Mathematik arbeitete erhielt ich einen Studienplatz für Medizin in München. Im November 1980 begann ich mit den Experimenten zur Doktorarbeit und führte diese mit Unterbrechungen (Staatsexamen, Praktisches Jahr) bis November 1983 durch.

Im Oktober 1983 erhielt ich meine Approbation als Arzt.

